BAND 40, HEFT 1 NOVEMBER 1960

PHYTOPATHOLOGISCHE ZEITSCHRIFT

Begründet von Prof. Dr. E. Schaffnit

Unter Mitwirkung von

Prof. Dr. E. Baldacci, Mailand / Prof. Dr. H. Braun, Bonn / Prof. Dr. W. B. Brierley, Keswick-Cumberland / Prof. Dr. N. Hiratsuka, Tokyo / Oberreg.-Rat i. R. Dr. E. Köhler, Braunschweig / Prof. Dr. K. O. Müller, Canberra / Prof. Dr. H. M. Quanjer, Wageningen / Prof. Dr. T. S. Sadasivan, Madras / Prof. Dr. Tr. Savulescu, Bukarest Prof. Dr. K. Silberschmidt, São Paulo / Prof. Dr. E. C. Stakman, St. Paul

herausgegeben von den Professoren

E. Gäumann Zürich

M. Klinkowski Aschersleben

H. Richter Berlin-Dahlem

Mit 40 Abbildungen

1960

PAUL PAREY IN BERLIN UND HAMBURG

Phytopath. Z. Bd. 40 Heft 1 *S. 1—108 Berlin 1960*

Postverlagsort Berlin

COMMONWEALTH MYCOLOGICAL 7 DEC 1960

INHALT

Abhandlungen

CHITZANIDIS, ANNA, Untersuchungen über das Verhalten von Kartoffel- und Tomatenrassen der *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary gegenüber organischen und anorganischen Fungiziden. Mit 16 Abb. 1

HIRAI, T., and T. SHIMOMURA, The mode of action of some antibiotics in their inhibitory effect on tobacco mosaic virus multiplication. With 6 figures 35

GÄUMANN, E., ST. NAEF-ROTH und H. KERN, Zur phytotoxischen Wirksamkeit der Enniatine. Mit 2 Abb. 45

SCHMELZER, K., R. BARTELS und M. KLINKOWSKI, Interferenzen zwischen den Viren der Tabakätzmosaik-Gruppe. Mit 10 Abb. 52

PILET, P.-E., Auxin content and auxin catabolism of the stems of *Euphorbia cyparissias* L. infected by *Uromyces pisi* (Pers.). With 4 figures 75

TRÖGER, R., Studien zur fungiziden Wirkungsweise der Kupfer-Kalzium-Verbindungen. Mit 2 Abb. 91

Besprechungen 107

Manuskripte: In deutscher, englischer, französischer oder italienischer Sprache abgefaßte Originalarbeiten werden druckfertig und möglichst in Schreibmaschinenschrift erbeten. Aufnahme von Tabellen und Abbildungen unterliegt jeweils vorheriger Vereinbarung.
„Kurze Mitteilungen" sind solche Veröffentlichungen in den vorerwähnten Sprachen, die im allgemeinen einen Umfang von vier Druckseiten nicht übersteigen. Sie erscheinen möglichst schon im nächsten Heft.
Die „Besprechungen" erscheinen nur in deutscher Sprache.

Herausgeber: Prof. Dr. E. GÄUMANN, Zürich 6, Universitätsstraße 2, Prof. Dr. M. KLINKOWSKI, Aschersleben, Ermslebener Str. 52, und Prof. Dr. H. RICHTER, Berlin-Dahlem, Königin-Luise-Str. 19. Zusendung der Manuskripte von Originalarbeiten und „Kurzen Mitteilungen" entweder an den Verlag Paul Parey, Berlin SW 61, Lindenstraße 44/47, oder an einen der drei Herausgeber.
Zusendung der „Besprechungen" unmittelbar an Prof. RICHTER, Berlin-Dahlem. Soweit nicht eine Aufforderung der Herausgeber zur Besprechung bestimmter Arbeiten ergangen ist, empfiehlt es sich, Prof. RICHTER vorher von der Absicht der Besprechung zu verständigen.

Honorierung: Das Mitarbeiterhonorar für Originalarbeiten und „Kurze Mitteilungen" beträgt 32,— DM je Druckbogen von 16 Seiten. Bei Beiträgen von mehr als drei Bogen werden nur die ersten drei Bogen honoriert; Dissertationen und Buchbesprechungen sind honorarfrei.

Sonderdrucke: Jeder Mitarbeiter erhält unberechnet 30 Sonderdrucke seines Beitrages (Originalarbeiten und Kurze Mitteilungen). Mehrbedarf gegen Berechnung.

Vorbehalt aller Rechte, insbesondere auch der photomechanischen Vervielfältigung: Alle Rechte, auch die der Übersetzung, des Nachdrucks und der photomechanischen Wiedergabe sind vorbehalten. Gewerblichen Unternehmen wird die Anfertigung einer photomechanischen Vervielfältigung von Beiträgen oder Beitragsteilen für den innerbetrieblichen Gebrauch durch Photokopie, Mikrokopie und dergleichen, nach Maßgabe des zwischen dem Börsenverein des Deutschen Buchhandels und dem Bundesverband der Deutschen Industrie abgeschlossenen Rahmenabkommens vom 14. 6. 1958, gegen Bezahlung der dort vorgesehenen Gebühr bis zu 3 Exemplaren gestattet. Die Vervielfältigungen haben einen Vermerk über die Quelle und den Vervielfältiger zu tragen. Die in dem Rahmenabkommen vorgesehene Gebühr ist an die Inkassostelle für Photokopiergebühren beim Börsenverein des Deutschen Buchhandels e. V., Frankfurt/M., Gr. Hirschgraben 17-19, zu entrichten. Erfolgt die Entrichtung der Gebühren durch Wertmarken der Inkassostelle, so ist für jedes Photokopierblatt eine Marke im Werte von DM 0,30 zu verwenden. Mit der Überlassung des Manuskriptes überträgt der Verfasser dem Verlag das Recht zu dieser Genehmigung.

Erscheinungsweise: Die Zeitschrift erscheint in zwangloser Folge. Jährlich erscheinen etwa 10—12 Hefte, von denen 4 einen Band bilden. Jedes Heft enthält etwa 7 Druckbogen.

Bezugsbedingungen: Der Preis des Bandes richtet sich nach dem Umfang. Er beträgt je Druckbogen von 16 Seiten etwa 3,75 DM. Die Hefte sind auch einzeln käuflich. Das Abonnement verpflichtet zum Bezug eines ganzen Bandes. Es verlängert sich jeweils, falls nicht spätestens unverzüglich nach Eingang der letzten Lieferung des berechneten Bandes Abbestellung erfolgt.

Verlag: Paul Parey, Berlin SW 61, Lindenstraße 44/47, Telefon 61 44 68/69. Printed in Germany (Westberlin).

Abonnementspreis dieses Heftes 27,40 DM **Einzelpreis 30,— DM**

Untersuchungen über das Verhalten von Kartoffel- und Tomatenrassen der *Phytophthora infestans* (Mont.)de Bary gegenüber organischen und anorganischen Fungiziden

Von

ANNA CHITZANIDIS

Mit 16 Abbildungen

Inhalt: I. Einleitung. — II. Experimenteller Teil. A. Beobachtungen im Freiland. 1. Feldversuche; 2. Isolierung und Identifizierung der auf Tomaten aufgetretenen Rassen von *Phytophthora infestans*. B. Beobachtungen unter kontrollierten Bedingungen. 1. Gewächshausversuche; a) Material und Methode, b) Versuche mit Kupfer, 1. Kartoffelstämme, 2. Tomatenstämme, c) Versuche mit Zineb, 1. Kartoffelstämme, 2. Tomatenstämme; 2. Laboratoriumsversuche (Sporenkeimteste); a) Methodik, b) Versuche mit Kupfer, c) Versuche mit Zineb; 3. Versuche zur Rassenänderung. — III. Besprechung der Ergebnisse. — Zusammenfassung. — Summary. — Literaturverzeichnis.

I. EINLEITUNG

Kurz nach der Entdeckung der fungiziden Wirksamkeit der Kupferkalkbrühe gegenüber dem falschen Mehltau der Weinrebe wurde dieses Mittel auch zur Bekämpfung von *Phytophthora infestans* verwendet. Die ersten Ergebnisse entsprechender Versuche veröffentlichte PRILLIEUX 1888. Seit dieser Zeit wurde die Kupferkalkbrühe neben anderen Kupferpräparaten mit Erfolg gegen *Phytophthora infestans* angewendet.

Erst die Entwicklung der Äthylendithiokarbamate (Zineb usw.) engte die alleinige Verwendung dieser Mittel ein, da die neuen Präparate außer ihren guten fungiziden Eigenschaften im Gegensatz zu den Kupfermitteln keine schädigenden Einflüsse auf die Wirtspflanze ausüben. So ist es auch erklärlich, daß 1950, fünf Jahre nach ihrem Erscheinen, in den USA die Krautfäule fast ausschließlich mit Zineb bekämpft wurde (DIMOND und HORSFALL 1955).

Bei Feldversuchen wiesen die organischen Fungizide — wenigstens in den meisten Fällen — die gleiche Wirksamkeit auf wie die anorganischen. Es kommt jedoch vor, daß die Wirkung der organischen Präparate hinter der-

jenigen der anorganischen zurücksteht. Auf Grund der Laboruntersuchungen von RICH (1954) wird allgemein angenommen, daß die Ursache hierfür in der festen Bindung des Kupferbelages an die Blattoberfläche zu suchen ist; die organischen Fungizide werden demgegenüber wegen ihrer geringeren Haftfähigkeit leichter abgewaschen. Die gleiche Feststellung machte man schon vorher in der Praxis und verwendete in Jahren bzw. Gegenden mit hohen Niederschlägen weiterhin bevorzugt die Kupferpräparate.

Ein Mißlingen der Bekämpfung von *Phytophthora infestans* wurde also bisher allein auf die Eigenschaften der Fungizide zurückgeführt. Der Pilz hingegen wurde nicht berücksichtigt. Es wäre jedoch durchaus denkbar, daß beim Pilz verschieden empfindliche Rassen vorhanden sein können, die eine unterschiedliche Wirksamkeit der Funigizide bedingen. Diese These könnte durch verschiedene Beobachtungen von Seiten der Praxis gestützt werden, nach denen sich *Phytophthora infestans* auf Kartoffeln besser mit organischen Fungiziden bekämpfen läßt als auf Tomate. Die Kupfermittel dagegen zeigten sich bei beiden Wirtspflanzen gleich wirksam. Neben der Möglichkeit, daß bei der unterschiedlichen Wirksamkeit der organischen Präparate auf den beiden Wirten die Pflanze selbst oder die klimatischen Bedingungen von Bedeutung sind, steht die Frage im Vordergrund, ob die Tomatenrassen des Pilzes widerstandsfähiger gegenüber diesen Bekämpfungsmitteln sind als die Kartoffelrassen.

Ein erster Hinweis auf das Auftreten wirtsspezifischer Rassen auf Kartoffel und Tomate stammt von MELHUS (1916); den Beweis erbrachte BERG (1926). Seit den ausführlichen Untersuchungen von RÖDER (1935), der das Thema erneut aufgegriffen hatte, nimmt man allgemein an, daß Tomatenlaub spontan nur von Tomatenrassen befallen werden kann, aber nicht von auf Kartoffel vorkommenden Rassen.

Darüber hinaus wurde *Phytophthora infestans* in zahlreiche physiologische Rassen (Biotypen) aufgegliedert, die verschiedene Sorten der gleichen Wirtsart befallen. So bewies SCHICK (1932) das Auftreten einer neuen Rasse, die bis dahin resistente Kartoffelsorten (die W-Rassen von K. O. MÜLLER) befallen konnte. BLACK und Mitarbeiter zählen 1953 in ihrer Arbeit über die Nomenklatur der Biotypen von *Phytophthora infestans* auf Kartoffel schon 16 einzelne Rassen auf. Ähnlich liegen die Verhältnisse bei Tomate. So isolierte GALLEGLY 1952 von Tomate verschiedene Rassen, die sich auf Grund ihrer Pathogenität gegenüber Nachkommen von Wildformen unterscheiden ließen und ordnete diese in weiteren Arbeiten (GALLEGLY und MARVEL 1955, WILSON und GALLEGLY 1955) systematisch ein.

Wie sich die beiden wirtsartspezifischen Rassengruppen bei der Bekämpfung des Pilzes verhalten, soll in den folgenden Untersuchungen geklärt werden. Dabei wird im ersten Teil die Wirksamkeit der Fungizide im Freiland unter Berücksichtigung der auftretenden Rassen untersucht.

Im zweiten Teil werden die vom Feld isolierten Rassen unter Gewächshaus- und Laborbedingungen auf ihre Empfindlichkeit gegenüber den Fungiziden geprüft. Außerdem wurde noch untersucht, wie sich diese Empfindlichkeit bei der Umwandlung einer Rasse in eine andere verhält.

II. EXPERIMENTELLER TEIL

A. Beobachtungen im Freiland

In den Jahren 1957, 1958 und 1959 wurden im Freiland Spritzversuche zur Bekämpfung von *Phytophthora infestans* auf Tomate durchgeführt. Dabei wurde einmal die Wirksamkeit der Fungizide im Felde geprüft, zum anderen wurden die aufgetretenen Pilzrassen isoliert und bestimmt.

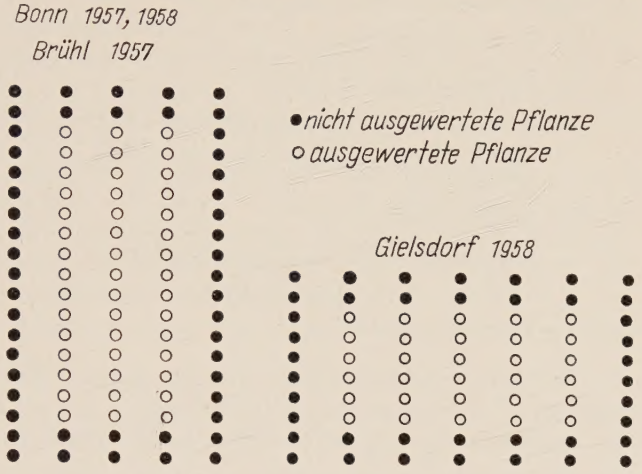

Abb. 1. Aufbau einer Parzelle

1. Feldversuche

Es wurde jeweils ein Versuch auf dem Versuchsfeld des Instituts in Bonn, ein Parallelversuch im Vorgebirge, und zwar 1957 in Brühl, 1958 in Gielsdorf und 1959 in Lengsdorf, angelegt. Da im trockenen Sommer 1959 *Phytophthora infestans* überhaupt nicht auftrat, erübrigt sich eine Besprechung der Versuche dieses Jahres.

Als Vertreter der kupferhaltigen, anorganischen Fungizide wurde Kupferoxychlorid, als Vertreter der organischen Zineb ausgewählt. Außerdem wurden Fungizide beider Gruppen verwen-

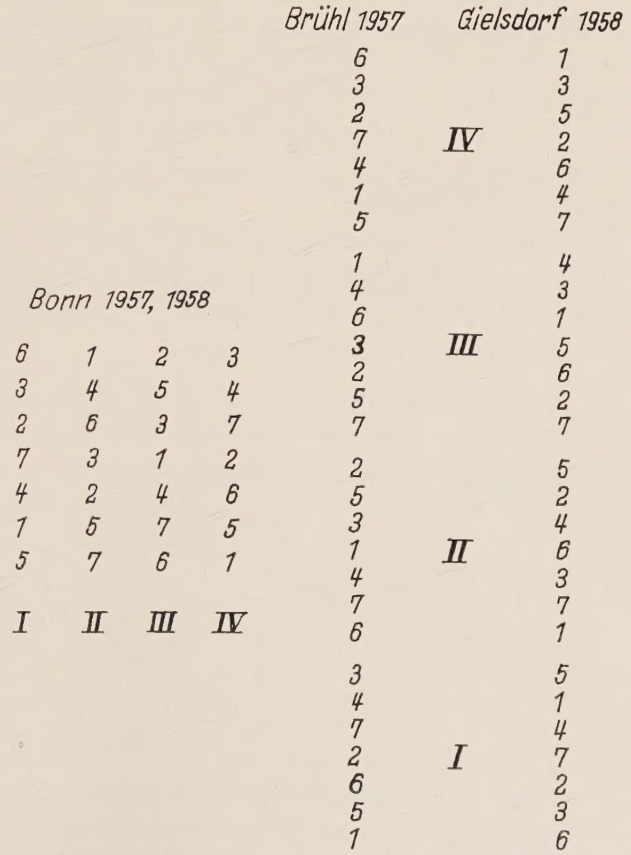

Abb. 2. Anordnung der Parzellen und Blöcke

det, die für die Praxis von Interesse sein könnten. Dementsprechend ergeben sich folgende sieben Behandlungen:

1	M — 22 (Maneb)	0,3 %
2	Dithane-Cela (Zineb)	0,3 %
3	Rotkupfer-Spritzmittel (Bayer) 1957 Kupfer-Sandoz (Fahlberg-List) 1958 (Rotkupfer)	0,5 %
4	unbehandelt	
5	Cupravit — Ob 21 (Grünkupfer)	1,0 %
6	Dithane — Kupfer — Cela	0,5 %
7	Cupravit — Ob 21	0,5 %

Die sieben Versuchsglieder wurden in vier Wiederholungen im „Block" angelegt, so daß im ganzen jeder Versuch 7 × 4 = 28 Parzellen hatte. Über die Versuchsanordnung unterrichten nachfolgende Angaben:

Pflanzenabstand in der Reihe: 0,40 m.

Reihenabstand: Bonn 1957, 1958 und Brühl 1,0 m, Gielsdorf 1,1 m

Parzellengröße: Bonn 1957, 1958 und Brühl 5 Reihen zu je 19 Pflanzen = 95 Pflanzen = 5 m × 7,6 m = 38 m², Gielsdorf 7 Reihen zu je 10 Pflanzen = 70 Pflanzen = 7,7 m × 4,0 m = 30,8 m².

Auswertbare Pflanzen je Parzelle: Bonn 1957, 1958 und Brühl 3 Reihen zu je 15 = 45 Pflanzen.

Gielsdorf 5 Reihen zu je 6 = 30 Pflanzen.

Die Anordnung der Pflanzen in einer Parzelle und der Parzellen und Blöcke in jedem einzelnen Versuch zeigen die Abbildungen 1 und 2.

Tomatensorte: Rheinlands Ruhm.

Vorfrucht: Bonn 1957 Kartoffeln, Brühl 1957 Stangenbohnen, Bonn 1958 Kartoffeln, Gielsdorf 1958 Wirsingkohl.

Düngung: Bonn 1957, 1958 120 kg/ha N (Kalkammonsalpeter 20,5 %)
80 kg/ha P (Superphosphat 17 %)
180 kg/ha K (Patentkali 25 bis 30 %);

Brühl 1957 160 kg/ha K (Chlorkali 40 %)
72 kg/ha N (Nitrophoska blau 12 %)
72 kg/ha P (Nitrophoska blau 12 %)
120 kg/ha K (Nitrophoska blau 20 %)
100 kg/ha N (Kalkammonsalpeter 20 %)
(zwischen den Reihen);

Gielsdorf 1958 84 kg/ha N (Nitrophoska blau 12 %)
84 kg/ha P (Nitrophoska blau 12 %)
160 kg/ha K (Nitrophoska blau 20 %).

Behandlungsgerät: Bonn 1957, 1958: Jacoby-Kolben-Rückenspritze, Brühl 1957: Rückentragbare Hochdruckspritze mit abnehmbarer Füllpumpe, „Hatlapa"-Metersen/Holst., Gielsdorf 1958: Jacoby-Kolben-Rückenspritze für 1. bis 3. Spritzung, „Holder"-Motor-Karrenspritze MP 1 für 4. bis 7. Spritzung.

Die Spritztermine lagen im allgemeinen 14 Tage auseinander, wobei aber die jeweilige Witterung berücksichtigt wurde. Die Spritzungen wurden 1957 schon Ende August bzw. Anfang September eingestellt, da die niedrigen Temperaturen einen weiteren Befall ausschlossen. Die Aufwandmenge der Fungizide entsprach den ortsüblichen Gewohnheiten.

Spritztermine und Fungizidmengen sind aus Tabelle 1 und 2 zu entnehmen.

Tabelle 1

Spritztermine der vier Versuche

Spritzg.	Bonn 1957	Präp.	Brühl	Präp.	Bonn 1958	Präp.	Gielsd.	Präp.
I.	11. 7. 1957	alle	10. 7. 1957	1, 2, 3	25. 6. 1958	alle	10. 7. 1958	alle
II.	24. 7. 1957	alle	16. 7. 1957	5, 6, 7	8. 7. 1958	alle	25. 7. 1958	alle
III.	14. 8. 1957	alle	26. 7. 1957	1, 2, 3	21. 7. 1958	alle	6. 8. 1958	alle
IV.	30. 8. 1957	alle	30. 7. 1957	5, 6, 7	5. 8. 1958	alle	18. 8. 1958	alle
V.	—	—	2. 8. 1957	alle	18. 8. 1958	alle	29. 8. 1958	alle
VI.	—	—	19. 8. 1957	1, 2, 3	—	—	9. 9. 1958	alle
VII.	—	—	22. 8. 1957	5, 6, 7	—	—	23. 9. 1958	alle
VIII.	—	—	3. 9. 1957	alle	—	—	—	—

1 = M — 22, 2 = Dithane, 3 = Rotkupfer, 4 = unbehandelt, 5 = Ob 21, 1 %, 6 = Dithane-Kupfer, 7 = Ob 21, 0,5 %.

Tabelle 2

Gesamtmenge der angewendeten Fungizide in kg/ha

Nr.	Präparat	Bonn 1957	Brühl 1957	Bonn 1958	Gielsd. 1958
1	M — 22	1,8	11,0	1,8	6,0
2	Dithane-Cela	1,8	11,0	1,8	6,0
3	Rotkupfer	3,0	18,4	3,0	10,0
4	unbehandelt	—	—	—	—
5	Ob 21, 1 %	6,0	32,8	6,0	20,0
6	Dithane-Kupfer ...	3,0	18,4	3,0	10,0
7	Ob 21, 0,5 %	3,0	18,4	3,0	10,0

Bonitiert wurde bei der Ernte, indem von den jeweils reifen Früchten die von *Phytophthora* befallenen aussortiert wurden. Das Gewicht der letzteren ist in Tabelle 3 sowie in Abbildung 3 in Prozent des Gesamtertrages je Behandlung aufgeführt.

Tabelle 3

Gewicht der befallenen Früchte in Prozent des Gesamtertrages je Behandlung

Block	M — 22	Dithane	Rot-kupfer	Unbe-handelt	Ob 21 1 %	Dithane-kupfer	Ob 21 0,5 %
			Bonn 1957				
A	0,58	0,66	0,05	7,51	0,08	0,10	0,33
B	0,34	0,70	0,08	8,69	0,15	0,15	0,24
C	0,50	1,02	0,17	7,97	0,11	0,09	0,04
D	1,03	0,44	0,25	11,78	0,17	0,04	0,21
Σ	2,45	2,82	0,55	35,95	0,51	0,38	0,82
$\bar{x}$	0,61	0,71	0,14	8,99	0,13	0,09	0,25
			Brühl 1957				
A	1,87	3,28	2,01	58,37	4,58	1,36	2,44
B	3,12	2,73	4,09	57,09	2,31	1,73	2,05
C	2,19	2,16	2,50	53,34	2,02	3,42	2,69
D	3,50	3,78	2,81	53,90	1,98	3,90	2,90
Σ	10,68	11,95	11,41	222,70	10,89	10,41	10,08
$\bar{x}$	2,67	2,99	2,85	55,67	2,72	2,60	2,52
			Bonn 1958				
A	0	0	0,16	3,09	0,02	0	0,08
B	0	0,17	0,04	2,05	0	0	0
C	0	0,05	0,34	1,56	0,04	0	0
D	0	0	0	1,45	0	0	0
Σ	0	0,22	0,54	8,15	0,06	0	0,08
$\bar{x}$	0	0,05	0,13	2,04	0,015	0	0,02
			Gielsdorf 1958				
A	0	0,16	0,09	1,54	0,09	0	0,05
B	0	0,02	0,26	3,51	0,18	0,10	0,22
C	0,14	0,21	0,09	2,73	0,15	0	0,19
D	0,25	0,38	0,48	2,22	0,55	0,63	0,45
Σ	0,39	0,77	0,92	10,00	0,97	0,73	0,91
$\bar{x}$	0,10	0,19	0,23	2,50	0,24	0,18	0,23

Für Auswertung und Berechnung der Versuche wurden die Prozentwerte in arcus-sinus nach Bliss transformiert.

Der Bonner Versuch 1958 wurde nicht in die Auswertung einbezogen, da wegen des geringen Befalls viele Werte = 0 waren und eine Berechnung ausschlossen.

Die Auswertung der drei übrigen Versuche rechtfertigt folgende Schlüsse:

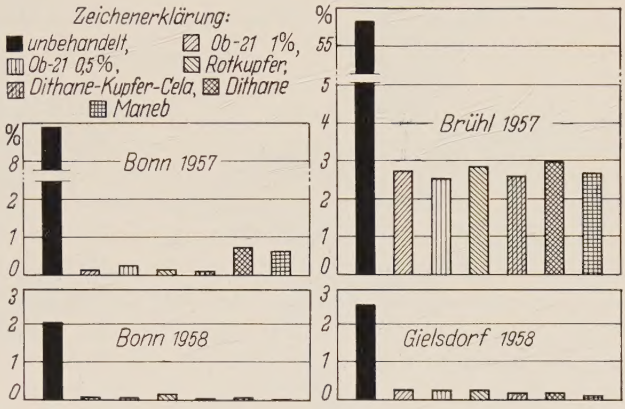

Abb. 3. Gewicht der befallenen Früchte in Prozent des Gesamtbetrages je Behandlung

1. In allen drei Versuchen zeigt der t-Test hoch gesicherte Unterschiede zwischen unbehandelten und behandelten Parzellen. Demnach haben alle Mittel stark gegen *Phytophthora infestans* gewirkt, wie es auch aus den Tabellen und Säulen deutlich zu sehen ist.

2. In den Versuchen Brühl 1957 und Gielsdorf 1958 lassen die Mittel bei Anwendung der Varianzanalyse keine gesicherten Unterschiede erkennen.

3. Im Bonner Versuch dagegen von 1957 treten solche auf.

Die Sicherungen bei P = 0,01 sind aus Tabelle 4 zu ersehen.

Tabelle 4

Mittel	Dithane 0,3 %	Rotkupfer 0,5 %	Ob 21 1 %	Kupfer-Dith. 0,5 %	Ob 21 0,5 %
Maneb 0,3 %	0	××	××	××	××
Dithane 0,3 %		××	××	××	××
Rotkupfer 0,5 %			0	0	0
Ob 21 1 %				0	0
Kupfer-Dithane 0,5 %					0

Dithane und Maneb waren demnach weniger wirksam als die übrigen Mittel. Für die Erklärung dieser Erscheinung muß zunächst auf die allgemein geringeren Fungizidmengen (Tab. 2) und die größeren Abstände zwischen den Behandlungen (Tab. 1, Bonn 1957, I. und II. Spritzung) hingewiesen werden. Unter diesen Umständen könnte die schon eingangs erwähnte Beobachtung, daß die Äthylendithiokarbamate schneller abgewaschen werden als die kupferhaltigen Mittel und daher in feuchten Jahren wie 1957 in geringeren Zeitabständen gespritzt werden müssen, erhöhte Bedeutung erhalten.

Denkbar wäre aber auch, daß auf dem Felde eine wirtsspezifische, gegenüber den organischen Fungiziden resistente Rasse vorhanden war. Dieser Frage soll nunmehr nachgegangen werden.

2. Isolierung und Identifizierung der auf Tomaten aufgetretenen Rassen von *Phytopthora infestans*

RÖDER hat 1935 gezeigt, daß Tomatenfrüchte sowohl von Kartoffel- als auch von Tomatenrassen befallen werden können; das Krankheitsbild ist in beiden Fällen das gleiche. Bei eigenen Isolierungen im Spätherbst 1956 wurden auf befallenen Tomatenfrüchten beide Rassen, die Tomatenrasse jedoch häufiger als die Kartoffelrasse, gefunden. Diese Beobachtung zeigte, daß in jedem Feldversuch untersucht werden muß, um welche Rassen es sich handelt. Für den Bonner Versuch 1957 war diese Frage besonders wichtig, da die Möglichkeit bestand, daß die gegenüber den anorganischen Fungiziden geringere Wirkung der organischen auf das Auftreten einer anderen Rasse zurückzuführen war. Weiterhin war epidemiologisch interessant festzustellen, welche Rassen den wirtschaftlichen Schaden an Tomatenfrüchten hervorrufen.

Als „Kartoffelrasse" wird hier ein Stamm bezeichnet, der Tomatenlaub nicht zu befallen vermag, als „Tomatenrasse" jeder Stamm, der Tomatenlaub befallen kann. Eine weitere Aufgliederung innerhalb der Rassen im Sinne von BLACK habe ich bei meinen Isolierungen nicht vorgenommen.

Als Differentialwirt zur Identifizierung der Rassen dienten junge Tomatenpflanzen, da sich nur auf deren Laub Tomaten- und Kartoffelrassen unterscheiden lassen; auf Kartoffellaub und -knollen sowie auf Tomatenfrüchten rufen beide Rassen die gleichen Symptome hervor (RÖDER 1935).

Die Unterschiede der Symptome und deren Entwicklung auf Blättern junger Tomatenpflanzen sind aus folgender Zusammenstellung und aus Abbildung 4 zu ersehen.

Tomatenrasse:

1. Feuchte, durchsichtige Flecke (Abb. 4, A).
2. Schnelle Vergrößerung der Flecke.
3. Bildung eines üppigen Rasens von Sporangienträgern.
4. Ausbreitung der Fäule auf den Blattstiel und von dort aus auf den Sproß.
5. Die Pflanze geht ein (Abb. 4, C rechts).

Kartoffelrasse:

1. Braune Punkte bzw. nekrotische Flecke (Abb. 4, B).
2. Die Flecke vergrößern sich wenig oder gar nicht.
3. Keine Bildung von Sporangienträgern bzw. vereinzelte Sporangienträger am Rande der Flecke.
4. Keine Ausbreitung der kranken Stellen.
5. Die stark befallenen Blätter fallen ab, die Pflanze wächst normal weiter (Abb. 4, C links).

Zur Bestimmung der Rassen wurden kranke Tomatenfrüchte in feuchten Kammern bei 21 °C aufbewahrt, nachdem die Epidermis am Rande der befallenen Stellen abgezogen worden war. Nach 3 bis 4 Tagen entwickelten sich an der Oberfläche der abgeschälten Teile der Frucht die Sporangienträger des

Abb. 4 A. Symptome der Tomatenrasse auf Tomatenblatt drei Tage nach der Infektion
Abb. 4 B. Symptome der Kartoffelrasse 0 auf Tomatenblatt drei Tage nach der Infektion
Abb. 4 C. Tomatenpflanze 6 Tage nach der Infektion mit Kartoffelrasse 0 (links) bzw. Tomatenrasse (rechts)

Pilzes. Die gebildeten Sporangien dienten zur Infektion junger Tomatenpflanzen, wobei diese erst mit destilliertem Wasser besprüht und anschließend mit der sporentragenden Oberfläche der Früchte leicht eingerieben wurden. Die infizierten Pflanzen standen bei 21 °C und in 100 % relativer Luftfeuchtigkeit. Auf Grund der Ausbildung der Symptome und ihrer weiteren Entwicklung ließen sich die beiden Rassen leicht bestimmen.

Isolierungen im Sommer 1957.

Der erste Befall auf Tomatenfrüchten zeigte sich schon Anfang August, während die ersten Symptome auf den Blättern trotz des feuchten Wetters erst Anfang September erschienen. Schon das ließ vermuten, daß der Schaden auf den Früchten im August von einer Kartoffelrasse verursacht worden war,

da eine Tomatenrasse nicht nur diese, sondern auch das Laub befallen hätte. Die Identifizierung der vorhandenen Rasse, die vom ersten Pflücken ab laufend vorgenommen wurde, bestätigte diese Vermutung: Sowohl in Bonn als auch in Brühl konnte im August nur die Kartoffelrasse isoliert werden.

Aus arbeitstechnischen Gründen mußten die Isolierungen Anfang September, gerade als die ersten Symptome auf dem Tomatenlaub auftraten, unterbrochen werden, so daß über die weitere Verbreitung der Rassen auf den Früchten nichts gesagt werden kann. Für den Bonner Versuch 1957 ist dieser vorzeitige Abschluß der Isolierungen jedoch belanglos.

In Tabelle 5 sind die Gewichte der jeweils befallenen Früchte in Prozenten des Gesamtgewichts zusammengestellt.

Tabelle 5

Gewicht der befallenen Früchte
in Prozent des Gesamtertrages je Behandlung im Bonner Versuch 1957
vom 8. August 1957 bis zum 2. September 1957

Block	M — 22	Dithane	Rotkupfer	Ob 21 1 %	Dithane-kupfer	Ob 21 0,5 %
A	0,569	0,824	0,0	0,161	0,0	0,534
B	0,401	0,897	0,0	0,0	0,073	0,298
C	0,659	1,241	0,0	0,186	0,131	0,0
D	0,569	0,165	0,364	0,0	0,0	0,320
Σ	2,198	3,127	0,364	0,347	0,204	1,152
$\bar{x}$	0,549	0,753	0,091	0,086	0,051	0,288

Die Sicherungen für diese Werte bei P = 0,01 und P = 0,05 sind folgende:

Mittel	Dithane	Rotkupfer	Ob 21 1 %	Dithane-Kupfer	Ob 21 0,5 %
M — 22	0	××	××	××	×
Dithane		××	××	××	×
Rotkupfer			0	0	0
Ob 21 1 %				0	0
Dithane-Kupfer ..					0

Die Zahlen lassen eindeutig erkennen, daß schon im August die Wirkung der organischen Fungizide deutlich hinter der der anorganischen zurückgeblieben war.

Isolierungen im Sommer 1958.

In diesem Jahr zeigten nur die Früchte Befall durch *Phytophthora infestans*, während die Blätter in der gesamten Vegetationsperiode nicht erkrankten. Während der ganzen Erntezeit wurden von beiden Feldversuchen

mehr als 100 Identifizierungen vorgenommen, die durchweg die Kartoffelrasse ergaben. Die gleiche Beobachtung wurde an zahlreichen anderen Beständen im Vorgebirge gemacht, von denen ebenfalls Früchte gesammelt und die Rassenzugehörigkeit untersucht wurde.

Aus diesen zweijährigen Beobachtungen kann einmal geschlossen werden, daß die unterschiedliche Wirkung der beiden Fungizide bei dem Bonner Versuch 1957 in keinem Zusammenhang mit den beiden wirtsspezifischen Rassen steht, da der Befall während der Beobachtungszeit eindeutig nur von der Kartoffelrasse verursacht worden ist. Zum anderen schädigt die Tomatenrasse von *Phytophthora infestans* Tomatenfrüchte offenbar nur unter besonderen Bedingungen, eine Beobachtung, auf die in der Diskussion noch näher eingegangen werden wird.

B. Beobachtungen unter kontrollierten Bedingungen

Da die Ergebnisse der Freilanduntersuchungen infolge Fehlens der Tomatenrassen keine Aussage über eine etwa unterschiedliche Empfindlichkeit von Tomaten- und Kartoffelrasse gegenüber organischen und anorganischen Fungiziden erlaubte, wurden Herkünfte beider Rassen unter kontrollierten Bedingungen im Gewächshaus und Laboratorium auf ihre Empfindlichkeit geprüft.

a) Material und Methode

1. Gewächshausversuche

1. Material

Die zur Prüfung verwendeten Stämme wurden von Kartoffel- und Tomatenlaub, sowie von Kartoffelknollen und Tomatenfrüchten isoliert. Die befallenen Pflanzenteile stammten meist aus der Umgebung von Bonn.

Die isolierten Stämme wurden zunächst auf Tomatenlaub getestet und auf Grund der Symptome in Kartoffel- bzw. Tomatenrassen aufgegliedert. Von einer weiteren Differenzierung der Tomatenrassen mußte abgesehen werden, da das dafür notwendige Testsortiment nicht zur Verfügung stand. Die Kartoffelrassen dagegen konnten auf dem Testsortiment nach MASTENBROEK (s. Tab. 6) noch weiter unterteilt werden.

Nach diesem Test gehörten sie etwa zu gleichen Teilen zu den Rassen 0 und 4 (nach BLACK et al. 1953).

Tabelle 6

Sorte bzw. Nr.	Gen
Erstling	r
M 43 154-5	R_1
M 44 158-4	R_2
M 4642-2	R_3
M 4431-5	R_4

Für die Erhaltung wurden die isolierten Stämme auf Knollen der Sorte Bona bzw. Erstling weiterkultiviert. Die durch einen Keilschnitt infizierten Knollen blieben bis zum Erscheinen der ersten Symptome bei 21 °C und lagerten anschließend bei 12 °C. Unter diesen Verhältnissen war eine Übertragung der Stämme erst nach 2 bis 3 Monaten notwendig.

Für die laufenden Versuche, die große Mengen von Sporenmaterial erforderten, wurde der Pilz in Glasschalen auf Knollenhälften gezogen, nachdem die Knollen äußerlich durch Eintauchen in Alkohol und Abflammen desinfiziert und mit einem ebenfalls desinfizierten Skalpell halbiert waren. Zur Infektion der Schnittflächen dienten Myzelflöckchen oder Sporensuspensionen; anschließend wurden die Hälften wieder zusammengeklappt; am dritten Tage erschien dann der erste Myzelrasen. In diesem Stadium wurden sie in einen 12 °C-Thermostaten gebracht. Diese Temperatur fördert einerseits die Bildung der Sporangien, andererseits verzögert sie das Wachstum von Bakterien und anderen sekundär auftretenden Mikroorganismen. Nach drei Tagen hatte sich genügend Sporenmaterial gebildet.

2. Methodik

Die Prüfung der Empfindlichkeit der einzelnen Stämme gegenüber organischen und anorganischen Präparaten wurde in Anlehnung an die Methode nach McCALLAN und WELLMAN (1943) — für Gewächshausteste mit Fungiziden — durchgeführt.

Die Spritzapparatur.

Zur Verteilung der Fungizide auf die Pflanzen im Spritzverfahren wurde eine von HARONSKA (nicht veröffentlicht) entwickelte Apparatur verwendet. Sie entspricht hinsichtlich Dosierung und Spritzbild den praktischen Verhältnissen anerkannter Spritzgeräte. Durch Wahl entsprechender Düsen und des Flüssigkeitsdruckes können alle interessierenden Sprühbilder (Tropfen $< 150\ \mu\ \phi$) und Spritzbilder (Tropfen $> 150\ \mu\ \phi$) erzeugt werden.

Die zu behandelnde Pflanze wird auf einem Fließband unter fächer- oder kegelförmig spritzender Düse durchgeführt, wobei der Abstand von Düse zu Pflanze verstellbar ist. Die Geschwindigkeit des Fließbandes, das von einem Elektromotor angetrieben wird, läßt sich mittels einer Transmission variieren.

Die Anordnung der einzelnen Teile der eigentlichen Spritzapparatur ist aus Abbildung 5 zu ersehen.

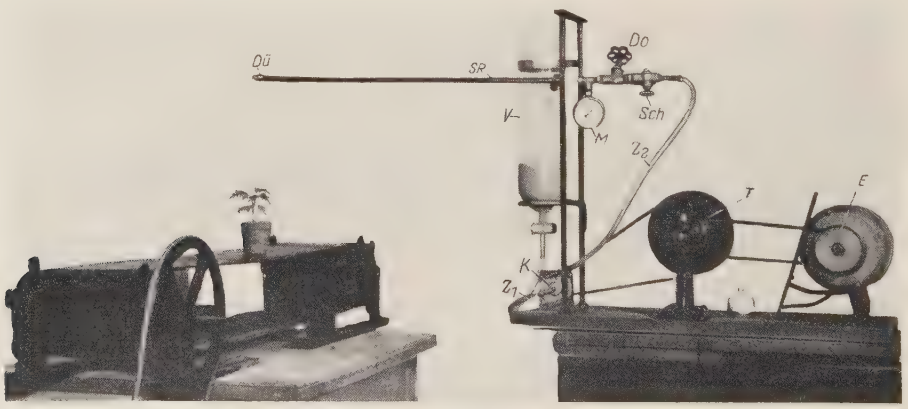

Abb. 5. Spritzapparat nach HARONSKA

Aus einem durchsichtigen Vorratsgefäß „V" (als Mensur geeicht) saugt die Kreiselpumpe „K" die Brühe durch die Zuleitung „Z_1" an. Die Kreiselpumpe wird von einem Elektromotor „E" über die Transmission „T" angetrieben. Der Pumpenausstoß erfolgt über die Leitung „Z_2" zu einer Manometerarmatur, bestehend aus dem Schnellverschlußhahn „Sch", Dosierschieber „Do" und Manometer „M", und von dort über ein verstellbares Spritzrohr „SR" zur Düse „Dü". Mit Hilfe der Manometerarmatur wird die Brühausstoßleistung der Düse ermittelt und kontrolliert.

Für die Versuche wurde eine fächerförmig verteilende Pralldüse (MK 12, Eltrille Gerätebau, 1 Bohrung je 1,2 mm Durchmesser, Prallabstand 0,3 mm, Prallflächendurchmesser 8 mm) benutzt. Düsenfächer und Fließbandrichtung trafen sich im rechten Winkel. Die Arbeitswerte der Düse sind in Tabelle 7 zusammengestellt.

Tabelle 7

Arbeitsbreite der Düse (m)	Liter/min	atü
0,60	0,27	1,3
0,60	0,26	1,2
0,40	0,20	0,8
0,28	0,17	0,6
0,15	0,12	0,3
0,15	0,11	0,2

Sind diese Werte bekannt, so kann die Menge der Spritzbrühe in Liter/ha durch folgende Formel (Haronska 1958) errechnet werden:

$$o = \frac{166{,}7 \cdot l}{m \cdot v}$$

o = l ha
166,7 = konstante Zahl
l = l/min
m = Arbeitsbreite in m
v = Fließbandgeschwindigkeit in m/sec

Für die laufenden Versuche wurde mit folgenden Werten gearbeitet: 1,3 atü, entsprechend 0,27 l/min und 0,60 m Arbeitsbreite; Fließbandgeschwindigkeit 0,32 m/sec; Abstand zwischen Düse und zu bespritzender Blattfläche 0,25 m.

Infektion und Inkubation.

Als Testpflanzen wurden Tomaten der Sorte „Lukullus" im Dreiblattstadium verwendet. Nach Aufbringen der Mittel blieben die Pflanzen 5 bis 6 Stunden stehen, bis der Spritzbelag angetrocknet war; dann wurden sie mit *Phytophthora infestans* infiziert.

Zur Infektion diente eine Sporensuspension von etwa 40 000 Sporangien je ml. Um die Keimung der Sporen zu fördern, wurde der Suspension als Stimulans 0,001 % Kaliumzitrat zugesetzt. Die fertige Sporenbrühe stand 3 Stunden in einem Thermostaten bei 12 °C. Nach dieser Zeit waren 60 bis 70 % der Sporangien gekeimt.

Die Suspension wurde mit einem gläsernen Zerstäuber mit 0,5 atü auf die Oberseite der Blätter gesprüht. Für jede Pflanze wurde etwa 1 ml Sporensuspension gerechnet.

Als Inkubationskammern dienten die von Schicke (1955) entwickelten Aluminiumkästen. Sie haben eine Bodenfläche von 0,86 × 0,40 m und eine

Höhe von 0,30 m. Hohe Luftfeuchtigkeit in den Kästen wird durch eine Lage von nassem Torf gesichert. In jedem Kasten können 12 × 5 = 60 6-cm-Töpfe aufgestellt werden.

Nach der Infektion wurden die Pflanzen in die Kästen eingeordnet und anschließend unter 21 °C gehalten.

Bonitierung und Auswertung der Versuche.

Bei der Prüfung von Fungiziden ist es üblich, das zu testende Präparat mit einem Standardmittel zu vergleichen, da die große Variabilität des Materials keine absolute Aussage erlaubt. Aus dem gleichen Grunde verglich ich bei meinen Versuchen die auf Empfindlichkeit bzw. Widerstandsfähigkeit zu prüfenden Stämme mit einem Standardstamm. Dafür suchte ich einen Stamm aus, der sich in Keimfähigkeit, Pathogenität und Verhalten gegenüber Fungiziden ziemlich konstant zeigte.

Um eine statistische Berechnung der Ergebnisse zu ermöglichen, wandte ich jedes Mittel in 5 Konzentrationen an; jedes Versuchsglied umfaßte dabei 5 Einzelpflanzen. Daraus ergab sich für jeden Kasten folgende Gruppierung von Pflanzen und Versuchsgliedern:

2 Stämme (Standardstamm und zu prüfender Stamm) × 6 Konzentrationen (5 behandelt und 1 unbehandelt) × 5 Pflanzen = 60 Pflanzen. Die Pflanzen wurden in jedem Kasten in „Blöcken" aufgestellt und im Block zufällig verteilt.

40 Stunden nach der Infektion wurden die Kästen zum Bonitieren geöffnet. Tomatensämlinge vertragen diesen längeren Lichtentzug ohne sichtbare Schädigung. Die sehr kurze Inkubationszeit ist auf den Zusatz von Kaliumzitrat zurückzuführen; bei Infektionen, die ohne dieses Stimulans vorgenommen wurden, betrug die bis zur Bonitierung notwendige Zeitspanne 60 Stunden.

Von jeder Pflanze wurden die untersten 10 Fiederblätter nach folgendem Schema bonitiert:

0 = kein Befall
1 = vereinzelte Flecke
2 = größere Anzahl von Flecken
3 = das ganze Fiederblatt befallen

Jeder Versuch wurde nach Bedarf 2- bis 3mal wiederholt. Die Auswertung der Versuche erfolgte nach der Probit-Analyse von FINNEY (1952).

b) Versuche mit Kupfer

Als kupferhaltiges Fungizid wurde Kupferoxychlorid (Ob 21 Bayer) in den Konzentrationen 1 %, 0,3 %, 0,1 %, 0,03 % und 0,01 % verwendet. Für diese Verdünnungsstufen war die Überlegung bestimmend, einerseits die in der Praxis üblichen Konzentrationen zu berücksichtigen, andererseits Befallswerte zwischen 20 und 80 % zu erreichen, was für die Versuchsauswertung von großem Vorteil ist.

1. Kartoffelstämme

Es wurden sieben Kartoffelstämme geprüft, von denen vier (Kc, Kg, Kr, Ks) zur Rasse 0 und drei (Kh, Kl, Kz) zur Rasse 4 gehören; der Standardstamm Ka, der als Vergleichsbasis für alle übrigen verwendet wurde, gehört ebenfalls zur Rasse 4.

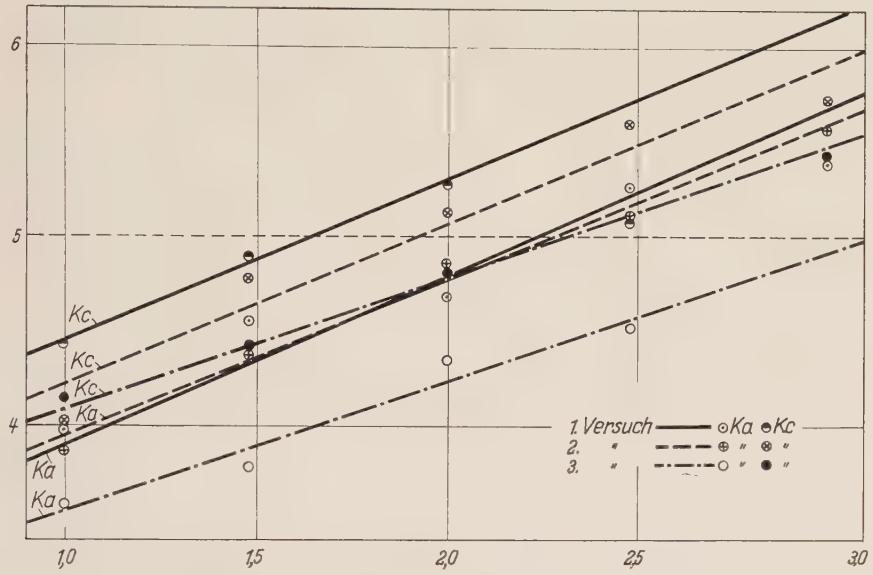

Abb. 6. Wirkungsgeraden von Ob 21 gegenüber den Stämmen Ka und Kc

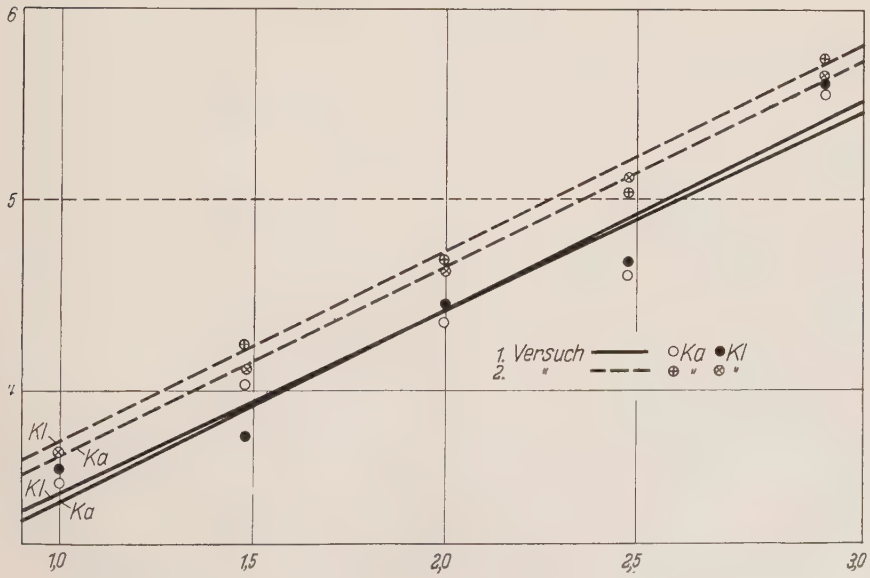

Abb. 7. Wirkungsgeraden von Ob 21 gegenüber den Stämmen Ka und Kl

In den Abbildungen 6 bis 8 sind die Ergebnisse einiger Versuche graphisch dargestellt. Auf der Abszisse sind jeweils die Logarithmen der Konzentrationen aufgetragen, auf der Ordinate die in Probits transformierten Prozentwerte des Befalls; die Dosiswirkungskurve wird dadurch — wie zu erwarten — in eine Gerade umgewandelt.

Für eine Beurteilung der Wirkungskurven muß zuerst festgestellt werden, ob die Geraden der einzelnen Stämme parallel zur Geraden des Standardstammes und parallel zueinander liegen. Ist dies der Fall, so ist die Wirkung jedes Fungizids auf die einzelnen Stämme gleich.

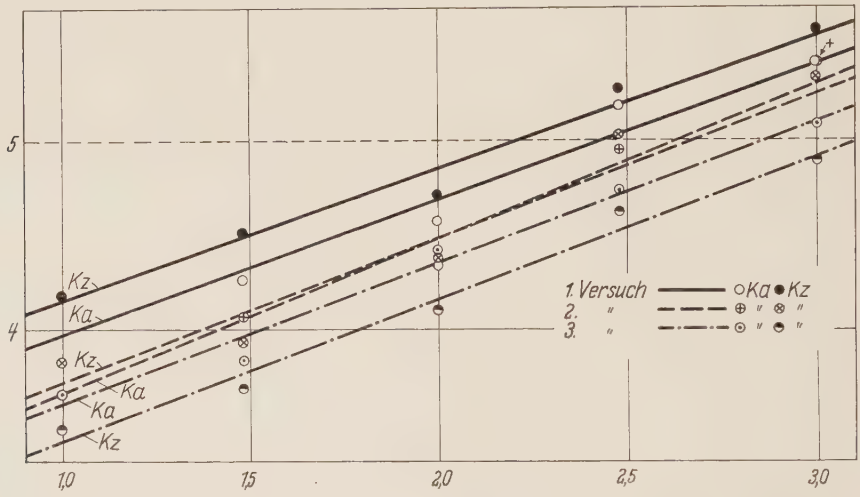

Abb. 8. Wirkungsgeraden von Ob 21 gegenüber den Stämmen Ka und Kz

Die Abbildungen zeigen, daß die jeweils zu einem Test gehörenden Geraden (Standardstamm und zu testender Stamm) parallel zueinander verlaufen. Etwas von der Parallelität abweichende Geraden können vom statistischen Standpunkt aus als parallel betrachtet werden. Infolgedessen kann dem Vergleich der Stämme die LD 50 als Ausdruck ihrer Empfindlichkeit zugrunde gelegt werden.

Von allen geprüften Stämmen erwies sich nur einer, Kc (Rasse 0), in allen Versuchen als empfindlicher als Ka. In Abbildung 6 liegen die jeweils zusammengehörenden Geraden der drei zeitlichen Wiederholungen relativ weit auseinander. Die relative Wirksamkeit, berechnet nach FINNEY (1952), beträgt beim ersten Versuch $p = 4{,}359 \pm 1{,}72$, beim zweiten $p = 2{,}306 \pm 0{,}56$ und beim dritten $p = 7{,}191 \pm 2{,}64$. Die p-Werte geben an, wieviel weniger Fungizid gegenüber Kc erforderlich ist, um den gleichen Effekt wie gegenüber Ka zu erreichen. So wird im 1. Versuch bei Kc 4,359mal weniger Fungizid als bei Ka benötigt, um dessen LD 50 zu erreichen. Obwohl die p-Werte der drei Wiederholungen stark schwanken, ist Kc stets empfindlicher als Ka.

Die übrigen Stämme können zusammengefaßt werden, da sie sich vom Standardstamm praktisch nicht unterscheiden.

In Abbildung 7 ist Stamm Kl (Rasse 4) mit Ka verglichen. Im ersten Versuch überlagern sich die zwei Geraden; im zweiten Versuch ist der Abstand zwischen ihnen so gering, daß sie als identisch angesehen werden können.

Ebenso verhielten sich die Stämme Kg (Rasse 0), Kr (Rasse 0) und Kh (Rasse 4). Wegen ihrer völligen Übereinstimmung mit dem Standardstamm ist auf ihre graphische Wiedergabe verzichtet.

Scheinbar etwas abweichend verhielt sich nur der Stamm Kz (Rasse 4). Im ersten Versuch zeigte er das gleiche Verhalten wie Ka, im zweiten erwies er sich als empfindlicher, im dritten als widerstandsfähiger (Abb. 8). Die Unterschiede waren jedoch so gering ($p = 1{,}6$), daß sie praktisch bedeutungslos sind. Der Stamm besitzt offenbar also nur eine größere Variabilität seiner Empfindlichkeit.

Das gleiche gilt auch für den Stamm Ks (Rasse 0).

2. Tomatenstämme

Die Versuche mit Tomatenstämmen wurden in gleicher Weise wie die mit Kartoffelstämmen durchgeführt. Als Standardstamm diente wiederum der Stamm Ka, als Wirtspflanzen wurden Tomaten im Dreiblattstadium verwendet. Obwohl Tomaten- und Kartoffelstämme auf Tomatenlaub unterschiedliche Krankheitsbilder verursachen, sind diese im ersten Stadium noch ähnlich genug, um eine Bonitierung nach dem angegebenen Schema zu ermöglichen.

Es wurden drei Tomatenstämme geprüft. In Abbildung 9 sind die Wirkungskurven eines dieser Stämme, T 1, in einmaliger zeitlicher Wiederholung dargestellt. Sie lassen keine Unterschiede zwischen Ka und T 1 erkennen. Ebenso verhielten sich die beiden anderen Tomatenstämme.

c) Versuche mit Zineb

Als Zinebpräparat diente Dithane-Cela in den Konzentrationen 0,3 %, 0,15 %, 0,07 %, 0,03 % und 0,015 %, bei denen ein Befall von 20 bis 80 % auftrat. Die erste Konzentration ist in der Praxis gebräuchlich.

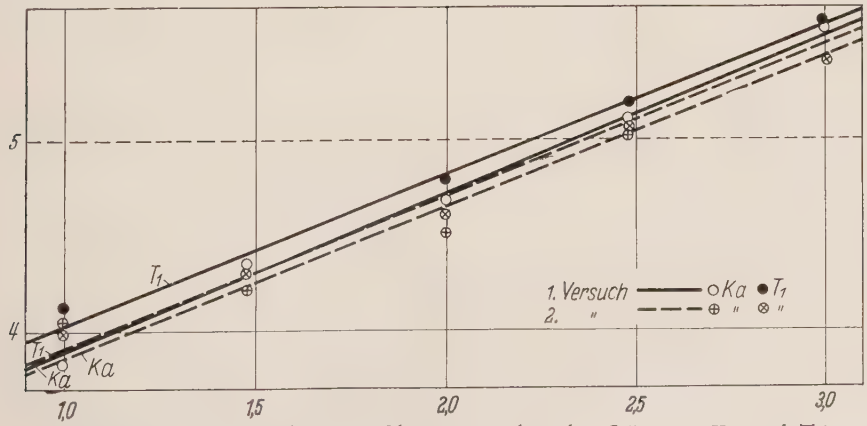

Abb. 9. Wirkungsgeraden von Ob 21 gegenüber den Stämmen Ka und T 1

1. Kartoffelstämme

Geprüft wurden dieselben Stämme wie in den Kupferversuchen. Ihr Verhalten stimmte in beiden Versuchsreihen weitgehend überein. Der Stamm Kc war wiederum empfindlicher als Ka (Abb. 10). Die relative Wirksamkeit betrug p = 4,67 ± 0,87 bzw. p = 3,515 ± 0,68. Die Geraden verlaufen steiler als bei Kupfer, demnach ist die Streuung geringer.

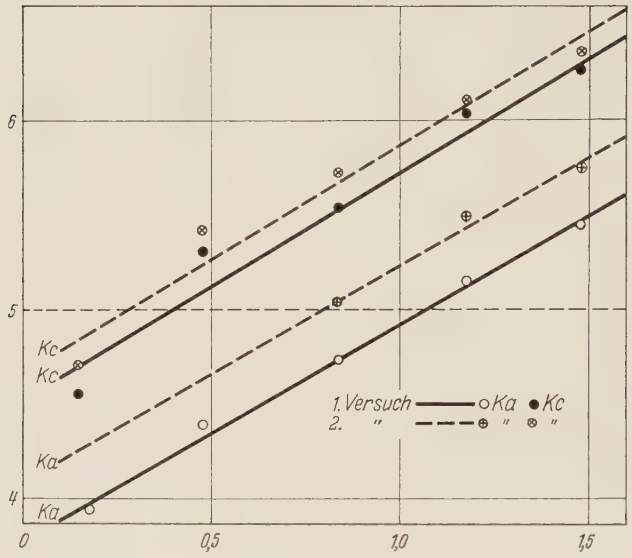

Abb. 10. Wirkungsgeraden von Dithane gegenüber den Stämmen Ka und Kc

Die übrigen Stämme ließen sich wiederum zusammenfassen, da sie sich nicht nennenswert voneinander unterschieden. In Abbildung 11 sind die Wirkungskurven von Stamm Kl aufgezeichnet. Der geringe Abstand zwischen Ka und Kl in der zweiten Wiederholung ist praktisch ohne Bedeutung.

2. Tomatenstämme

Auch das Verhalten der Tomatenstämme gegenüber Dithane entsprach dem gegenüber Kupfer. Abbildung 12 zeigt die Wirkungsgeraden des Stammes T 1 in zwei Versuchen als repräsentativ für das Verhalten der drei Tomatenstämme. Zwischen ihm und dem Standardstamm Ka bestehen keine Unterschiede.

Die Ergebnisse der Gewächshausversuche, bezogen auf den Standardstamm Ka, sind in Tabelle 8 noch einmal zusammengefaßt.

Aus der Parallelität der Geraden der verschiedenen Stämme geht eindeutig hervor, daß das einzelne Fungizid auf alle Herkünfte in gleicher Weise gewirkt hat.

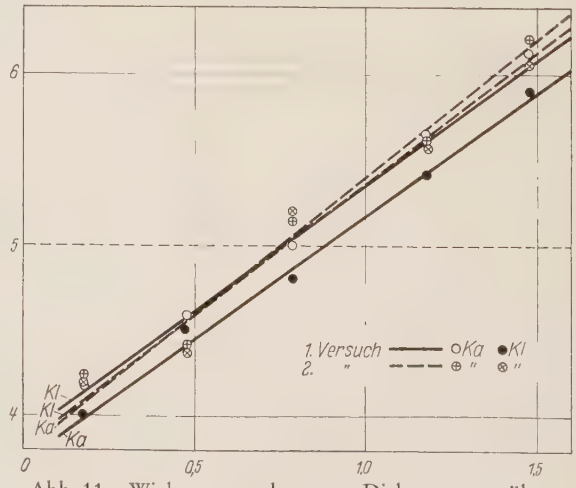

Abb. 11. Wirkungsgeraden von Dithane gegenüber den Stämmen Ka und Kl

Tabelle 8

Empfindlichkeit der geprüften Stämme gegenüber Ob 21 und Dithane im Vergleich zum Standardstamm Ka

Versuche mit Ob 21

Rasse	Kartoffelrasse 0				Kartoffelrasse 4		
Stamm	Kc	Kg	Kr	Ks	Kh	Kl	Kz
Empfindlichkeit im Vergleich zu Ka	größer	gleich	gleich	gleich	gleich	gleich	gleich

Versuche mit Dithane

Rasse	Kartoffelrasse 0				Kartoffelrasse 4		
Stamm	Kc	Kg	Kr	Ks	Kh	Kl	Kz
Empfindlichkeit im Vergleich zu Ka	größer	gleich	gleich	gleich	gleich	gleich	gleich

	Versuche mit Ob 21			Versuche mit Dithane		
Rasse	Tomatenrasse			Tomatenrasse		
Stamm	T 1	T 7	T 9	T 1	T 7	T 9
Empfindlichkeit im Vergleich zu Ka	gleich	gleich	gleich	gleich	gleich	gleich

Außerdem haben fast alle geprüften Stämme des Pilzes sowohl von der Kartoffel als auch von der Tomate die gleiche Empfindlichkeit gegenüber Kupferoxychlorid und Zineb gezeigt. Kleine Schwankungen bei einzelnen Stämmen können als individuelle Abweichungen angesehen werden. Eine Ausnahme macht nur der Kartoffelstamm Kc, der sich gegenüber den beiden Fungiziden immer empfindlicher als der Standardstamm Ka gezeigt hat.

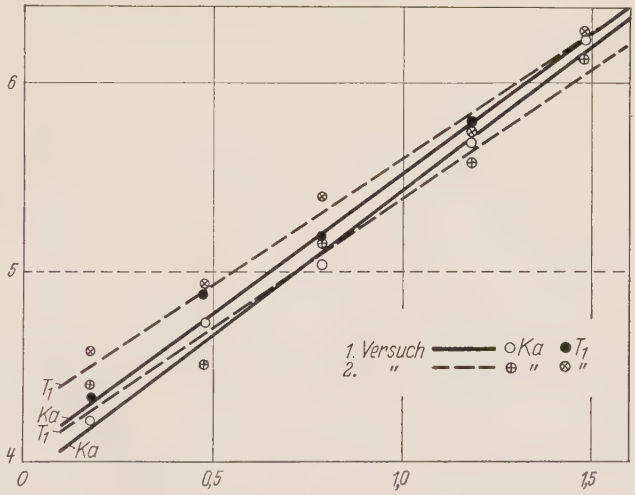

Abb. 12. Wirkungsgeraden von Dithane gegenüber den Stämmen Ka und T 1

2. Laboratoriumsversuche (Sporenkeimteste)

Anschließend an die bisher beschriebenen Gewächshausversuche wurden dieselben Stämme mit denselben Präparaten im Sporenkeimtest geprüft. Während die Reaktion des Pilzes im Pflanzentest durch eine Vielzahl nicht meßbarer und nicht konstant zu haltender Faktoren belastet ist, wird sie im Sporenkeimtest unter Ausschaltung der

Pflanze durch unmittelbare Einwirkung des Fungizids auf den Parasiten geprüft. Im Sporenkeimtest werden deshalb unter Umständen feinere Empfindlichkeitsunterschiede zu erfassen sein als im gröberen Gewächshausversuch.

a) Methodik

Wegen der Wichtigkeit des Sporenkeimtestes für die Fungizidprüfung haben sich zahlreiche Arbeiten ausschließlich mit der Entwicklung dieser Methode befaßt. Die Amerikanische Phytopathologische Gesellschaft hat sogar für die Durchführung dieses Testes „empfehlenswerte Methoden" vorgeschlagen (1943, 1947). In Anlehnung an diese und die von BLUMER und KUNDERT (1951) beschriebene Methode habe ich meine Versuche durchgeführt.

Wichtigste Voraussetzung für einwandfreie Ergebnisse eines Sporenkeimtestes sind möglichst hohe und konstante Keimprozente. Gerade diese ist bei *Phytophthora infestans* — wie zahlreiche eigene Versuche gezeigt haben — oft nur schwer zu erfüllen. ORTH und LEHMANN (1935) erwähnen die schwache Keimfähigkeit der *Phytophthora*-Sporangien, die sie auf lange Kultivierung des Pilzes auf Kartoffelknollen zurückführen; einige Passagen über Kartoffellaub ließen die Keimungsprozente wieder ansteigen. Einen solchen Passageeffekt konnte ich nicht erzielen. Andererseits fand ich bei meinen Versuchen keineswegs eine allgemein geringere Keimfähigkeit wie ORTH und LEHMANN, vielmehr war diese starken Schwankungen zwischen 35 und 95 % unterworfen. Deshalb suchte ich nach Möglichkeiten, die Keimfähigkeit nicht nur zu erhöhen, sondern vor allem konstanter zu halten. Der Erfolg eines Sporenkeimtestes hängt wegen der großen Empfindlichkeit der Sporen in besonderem Maße von der Sauberkeit der Glasgeräte ab, mit denen sie in Berührung kommen. Zum Säubern von Pipetten und Objektträgern benutzte ich bei Vorversuchen Chromschwefelsäure, mußte aber bald feststellen, daß auf dem Glas zurückbleibende Schwermetallspuren (Cr) die Keimung der Sporen stark beeinträchtigen können. Deshalb verwandte ich für die Versuchsreihen ausschließlich die schwermetallfreie Nitratschwefelsäure. Sie machte auch langes Spülen der Objektträger überflüssig, da letzte Spuren von Säure durch einige Tropfen flüssigen Ammoniaks im vorletzten Spülwasser leicht entfernt werden können.

In meinen Vorversuchen habe ich festgestellt, daß das Wasser für die Eignung der Sporangiensuspension eine entscheidende Rolle spielt. Die folgende Zusammenstellung zeigt die Keimprozente eines Stammes in verschiedenen Wasserproben.

Versuch	Leitungswasser	Leitungswasser, in Glas dest.	Ionenaustauscherwasser	Leitungswasser, in Glas doppelt dest.
1	89,7	71,5	64,0	92,25
2	86,0	68,0	36,0	94,25
3	95,0	72,25	82,0	96,0

In den Versuchsreihen wurde daher stets in Glas doppelt destilliertes Leitungswasser verwendet.

Um konstante Keimungsprozente zu erreichen, versuchte ich die Bedingungen in der Sporangiensuspension zu standardisieren. Zunächst wurden osmotische und pH-Werte der Suspension konstant gehalten. Die zu diesem Zweck zugefügten Salze (Natriumchlorid, prim. Kaliumphosphat, sek. Natriumphosphat, Natronlauge und Kaliumbiphthalat) wirkten jedoch hemmend auf die Keimung des Pilzes.

Die Beobachtung, daß Sporen von *Phytophthora infestans* sehr lebhaft keimten, wenn sich ihre Suspension in Berührung mit Tomatenlaub befand, veranlaßte mich, Stimulantien aus Tomatenblättern herzustellen, indem ich Preßsäfte, Extrakte und Destillate von Tomatenlaub in verschiedenen Konzentrationen gewann. Auch in ihnen schwankten die Keimprozente jedoch erheblich, vermutlich weil ihre Zusammensetzung nicht konstant war.

Die Amerikanische Phytopathologische Gesellschaft (1943, 1947) empfiehlt für Sporenkeimteste ein Spülen der Sporen durch Zentrifugieren und anschließend Zugabe von Stimulantien zur Sporensuspension, als welche sie sterilfiltrierten Apfelsinensaft oder verschiedene chemische Substanzen (Natriumzitrat, Kaliumzitrat, Äpfelsäure, Zitronensäure usw.) nennt. Die Sporangien von *Phytophthora infestans* vertragen aber ein Zentrifugieren sehr schlecht, da schon bei niedrigen Umdrehungszahlen je Minute, die zur Sedimentation der Sporen notwendig sind, die Keimfähigkeit gestört wird bzw. verlorengeht. Die Zugabe von Apfelsinensaft hemmte die Keimung völlig. Dagegen erwies sich Kaliumzitrat in einer 0,001%igen Lösung mit 0,2 % Rohrzucker als stark stimulierend. Es wurde auch von Miller (1949) mit Erfolg für die Keimungsförderung bei Zoosporen von *Phytophthora infestans* verwendet.

Für die Durchführung der Versuche wurden die Fungizide wiederum angesetzt und in gleichen Mengen in Reagenzgläser gebracht. Jedem Reagenzglas wurde das gleiche Volumen einer Sporensuspension mit Stimulans zugegeben. Das dafür notwendige Sporenmaterial wurde in der früher beschriebenen Weise angezogen. Die Suspension wurde so konzentriert, daß der Test nach Zusatz des Fungizids mit 40 000 Sporen je ml durchgeführt werden konnte.

Mit Hilfe einer 1 ml Pipette wurden von jeder Konzentration je sechs Tropfen auf einen Objektträger gebracht, der mit sechs Paraffinringen versehen war, damit sich die Tropfen auf einer gleichen Fläche ausbreiteten (Blumer und Kundert 1951). Vorversuche zeigten, daß Paraffin mit niedrigem Schmelzpunkt (42 bis 44 °C) wegen seiner optimalen Haftfähigkeit auf Glas besonders dafür geeignet ist. Jeder Objektträger wurde auf Glasstäbchen in eine 5 ml Wasser enthaltende Petrischale gelegt, die als feuchte Kammer diente. Die Schalen wurden bei 12 °C aufbewahrt, um eine indirekte Keimung der Sporangien zu gewährleisten.

Die Bonitierung erfolgte nach 16 bis 20 Stunden. Je Objektträger wurden vier Ringe ausgezählt, in jedem von diesen 100 Sporen. Zur Prüfung

wurden dieselben *Phytophthora*-Stämme herangezogen wie im Pflanzentest. Als Vergleichsbasis diente wiederum der Standardstamm Ka. Die Versuche wurden nach der Probit-Analyse von FINNEY (1952) ausgewertet.

b) Versuche mit Kupfer

Die Kupferversuche wurden mit Ob 21-Konzentrationen zwischen 0,00003 und 0,00025 % durchgeführt. Sie ergaben, wie die Pflanzenteste, jeweils parallele Wirkungsgeraden, so daß der Vergleich der Stämme leicht durchgeführt werden konnte.

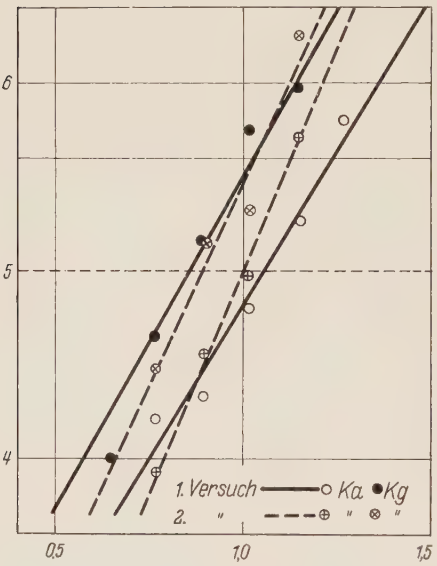

Abb. 13. Wirkungsgeraden von Ob 21 gegenüber den Stämmen Ka und Kg

Auch hier war der Stamm Kc dem Fungizid gegenüber empfindlicher als der Standardstamm Ka. Darüber hinaus reagierten diesmal aber auch die Stämme Kg, Kl, Kr und T_1 empfindlicher als Ka. In Abbildung 13 sind die Wirkungsgeraden von Ka und Kg in einfacher zeitlicher Wiederholung dargestellt. Die Auswertung nach der Probit-Analyse ergibt für den ersten Versuch eine relative Empfindlichkeit von $p = 1{,}6 \pm 0{,}056$ und für den zweiten von $p = 1{,}34 \pm 0{,}024$. Die Unterschiede sind also sehr gering; sie treten aber in jeder Wiederholung des Versuches gleichsinnig auf.

Die übrigen Kartoffel- und Tomatenstämme zeigten die gleiche Kupferempfindlichkeit wie Ka.

c) Versuche mit Zineb

Dithane wurde in Konzentrationen zwischen 0,0006 und 0,01 % verwendet. Wie bei den Kupferversuchen waren auch hier außer Stamm Kc die Stämme Kg, Kl, Kr und T_1 empfindlicher als Ka. Abbildung 14 zeigt die Wirkungsgeraden von Ka und Kg. Die übrigen Stämme stimmten wiederum mit dem Standardstamm überein.

Die Ergebnisse der Sporenteste lassen also erkennen, daß Unterschiede in der Empfindlichkeit der Stämme, die im Pflanzentest mit einer Ausnahme nicht zu erkennen waren, durch Verfeinerung der Methode, wie sie durch den Sporenkeimtest erreicht wird, eindeutig nachzuweisen sind. Ob und wie weit diese Unterschiede unter praktischen Verhältnissen Bedeutung gewinnen können, muß vorerst dahingestellt bleiben.

Eine weitere wichtige Erkenntnis läßt sich ableiten, wenn man aus den verschiedenen Wirkungsgeraden der beiden Fungizide einerseits im Pflanzen-, andererseits im Sporenkeimtest je eine mittlere Wirkungsgerade konstruiert, wie sie in Abbildung 15 dargestellt ist.

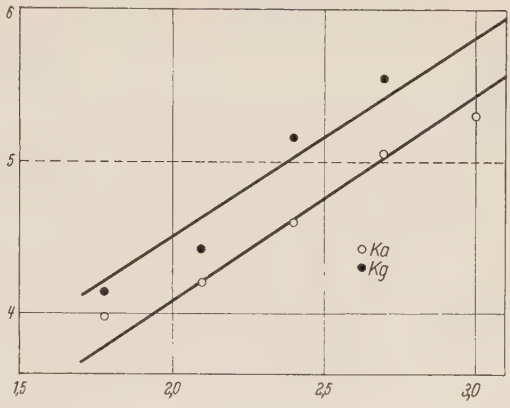

Abb. 14. Wirkungsgeraden von Dithane gegenüber den Stämmen Ka und Kg

Dann wird erkennbar, daß im Pflanzentest Ob 21 weniger wirksam ist als Dithane; seine LD 50 ist größer und seine Wirkungsgerade flacher als bei Dithane. Im Sporenkeimtest verhalten sich die beiden Fungizide genau umgekehrt. Damit wird die bereits 1953 von YARWOOD in Versuchen mit Bordeauxbrühe beobachtete Erscheinung bestätigt, daß Fungizide auf der Pflanze anders wirken als im Sporenkeimtest. Daß dabei ihre unterschiedliche Anwendung als getrockneter Belag (Pflanzentest) bzw. als Suspension (Sporenkeimtest) keine Rolle spielt, geht aus Versuchen von McCALLAN et al. (1941) mit angetrocknetem Kupfer im Sporenkeimtest hervor, die zu einer ebenso steilen Wirkungskurve führten wie bei den hier mit Kupfersuspension durchgeführten Sporenkeimtesten.

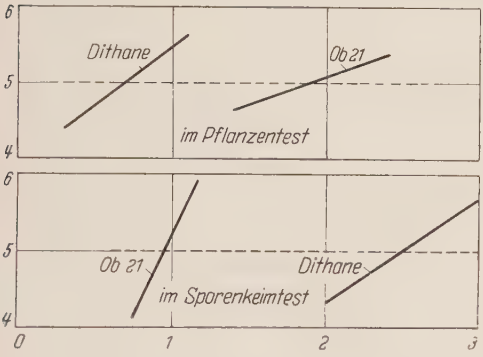

Abb. 15. Wirkungsgeraden von Ob 21 und Dithane bei Pflanzen- und Sporenkeimtest

3. Versuche zur Rassenänderung

Die bisherigen Versuche mit verschiedenen Stämmen der Kartoffel- und der Tomatenrasse von *Phytophthora infestans* hatten nur geringe Unterschiede in der Empfindlichkeit gegenüber beiden Fungiziden erkennen lassen. Im folgenden Abschnitt versuchte ich die Frage zu klären, ob diese Unterschiede individueller Natur sind oder auf rassenspezifischen Eigenschaften beruhen. In der Literatur ist wiederholt über die Erscheinung des sogenannten Passageeffekts berichtet worden. Läßt man einen Parasiten unter bestimmten Bedingungen über einen normalerweise nicht kongenialen Wirt passieren, so kann seine Pathogenität mehr oder weniger tiefgreifende Veränderungen erfahren. Das legte den Gedanken nahe, zu versuchen, einen der benutzten Stämme durch Passage und induzierte Mutation in seiner Aggressivität

und damit gleichzeitig in seiner Empfindlichkeit gegenüber Fungiziden zu verändern.

a) Passagen

REDDICK und MILLS (1938) konnten die Pathogenität eines Kartoffelstammes von *Phytophthora infestans* durch Passagen über widerstandsfähige Kartoffelsorten erhöhen. MILLS (1940) wandelte durch Passagen über Tomatenlaub eine Kartoffelrasse in eine Tomatenrasse um. Ähnliche Versuche wurden auch von DE BRUYN (1952) und MILLS und PETERSON (1952) mit Erfolg durchgeführt. HÜTTENBACH (1951) konnte durch Passageeffekt eine Kartoffel- in eine Tomatenrasse umwandeln, wobei er aber bei seinen Versuchen abwechselnd Knollenpassagen einschaltete, um mehr Infektionsmaterial zur Verfügung zu haben. Im Gegensatz dazu konnten BLACK (1952) und THURSTON und EIDE (1952) mit dem Passageeffekt keine Rassenänderung erzielen.

Ich versuchte zunächst, eine Kartoffelrasse in eine Tomatenrasse umzuwandeln. Dabei ging ich von einer Zoosporen-Einsporkultur der Rasse 0 aus. Die Einsporkultur sollte die Möglichkeit einer Selektion ausschließen. Die Rasse 0 wählte ich, weil bei ihr nach BLACK (1952) theoretisch die größte Wahrscheinlichkeit einer Änderungsmöglichkeit besteht. Dabei wurden mehrere Reihen von Passagen durchgeführt.

Abgetrennte ältere Blätter der Tomatensorte „Lukullus" wurden mit einer Zoosporensuspension des Stammes Kg, die in der beschriebenen Weise hergestellt war, infiziert. Nach der Infektion lagen die Blätter in feuchten Kammern bei 21 °C. Zwei bis drei Tage später erschienen die ersten nekrotischen Flecke, nach weiteren drei bis vier Tagen bildeten sich an deren Rand einige spärliche Sporangienträger, die abgetrennt und auf frische, vorher mit destilliertem Wasser besprühte Blätter übertragen wurden.

Trotz wiederholter Passagen über Tomatenblätter gelang es nicht, die Sporangienbildung zu steigern, vielmehr ging der Pilz nach sechs bis acht Übertragungen ein.

Ähnliche Versuche führte ich auf dem Laub der Kartoffelsorte M 4431—5 (R_4) durch, um Rasse 0 in Rasse 4 umzuwandeln. Auch in diesem Fall blieb ein Passageeffekt aus. Weitere Versuche, die nach der Methode von HÜTTENBACH (1951) durchgeführt wurden, verliefen ebenfalls negativ. Auf die Besonderheit dieser Methode wird in der Diskussion eingegangen werden.

In Übereinstimung mit den Ergebnissen von BLACK (1952) und THURSTON und EIDE (1952) konnte ich also eine Rassenänderung durch Passage nicht erzielen.

b) Induzierte Mutationen

Da den Passageversuchen ein Erfolg versagt blieb, versuchte ich, ob eine Rassenänderung durch induzierte Mutationen zu erreichen wäre. Zur Mutationsauslösung benutzte ich UV-Strahlen (SCHWINGHAMER 1959). Eine Sporensuspension einer Einsporkultur der Kartoffelrasse 0 wurde dem Licht einer Original Hanau „Höhensonne" Q 600 T ausgesetzt. Die Dauer der Bestrahlung betrug 40, 45 und 50 sec. Bei diesen Zeitspannen schwankten die Ab-

tötungsprozente des Sporenmaterials zwischen 80 und 95 %. Mit den verbliebenen bestrahlten Sporen wurden einerseits Tomatenblätter, andererseits Blätter der Kartoffelsorte M 4431—5 (R_1) infiziert. Bei einer Änderung der Pathogenität mußten erstere mit üppiger Sporangienbildung reagieren. Auf ihnen bildeten sich jedoch nur nekrotische Flecke, wie sie für Befall durch die Kartoffelrasse kennzeichnend sind. Die Pathogenität des Pilzes hatte sich also nicht geändert.

c) Spontane Rassenänderung

Im Laufe der Versuche wurde festgestellt, daß eine Einsporkultur des Stammes Kg (Rasse 0) sich plötzlich wie Rasse 4 verhielt. Sie befiel das Laub der Kartoffeltestsorte M 4431—5 (R_1), auf deren Blättern die typischen Flecke der Krautfäule erschienen und sich bei hoher Luftfeuchtigkeit ein üppiger Rasen von Konidienträgern bildete. Derartige spontane Rassenänderungen von *Phytophthora infestans* in Kultur sind schon öfter beschrieben worden (Black 1949, 1952, Henniger 1959). Nach Gallegly et al. (1959) tritt bei solchen spontanen Änderungen Rasse 4 häufig als „Mutante" auf.

Der nicht mutierte Stamm Kg erwies sich im Sporentest als etwas empfindlicher als Ka (Abb. 13 und 14). Der veränderte Stamm Kg 4 wurde nun im Sporenkeimtest geprüft, um festzustellen, ob die Umwandlung auch eine Änderung der Empfindlichkeit gegenüber Fungiziden zur Folge gehabt hatte. In Abbildung 16 sind die Wirkungsgeraden von dem Standardstamm Ka und Kg 4 im Sporenkeimtest mit Ob 21 dargestellt; Kg 4 erweist sich als empfindlicher als Ka, obwohl der Unterschied so gering ist, daß diese beiden Stämme als gleich empfindlich betrachtet werden können. Da Kg und Kg 4 sich gegenüber Ka gleich verhielten, wurden sie nicht weiter untereinander verglichen.

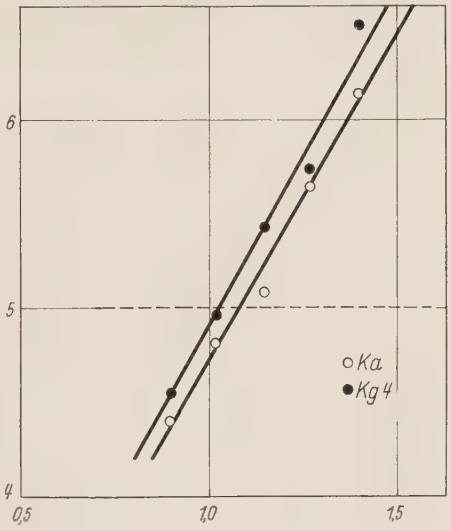

Abb. 16. Wirkungsgeraden von Ob 21 gegenüber den Stämmen Ka und Kg 4 im Sporenkeimtest

Die Rassenänderung ist also auf die Änderung der Pathogenität beschränkt geblieben und hat sich nicht auf die Empfindlichkeit gegenüber Ob 21 erstreckt.

III. BESPRECHUNG DER ERGEBNISSE

Für den manchmal unterschiedlichen Erfolg der chemischen Bekämpfung von *Phytophthora infestans* auf Tomate sind zwei Erklärungen möglich:

1. Bestimmte Rassen bzw. Herkünfte des Pilzes sind organischen Fungiziden gegenüber widerstandsfähiger als anorganischen.

2. Physikalisch-chemische Eigenschaften der geprüften Fungizide bedingen unterschiedliche Wirkungen.

Alle hier untersuchten Stämme sowohl der Kartoffelrassen 0 und 4 als auch der Tomatenrasse verhielten sich im Pflanzentest gleich. Eine Ausnahme machte nur der Stamm Kc der Rasse 0. Im Sporenkeimtest ließen mehrere Stämme gesicherte Unterschiede erkennen, die aber in keiner Beziehung zur Rassenzugehörigkeit standen. Daß eine solche nicht besteht, beweisen auch die Versuche zur Rassenänderung. Demnach läßt sich mit Sicherheit sagen, daß keine Unterschiede in der Empfindlichkeit der drei geprüften Rassen gegenüber Ob 21 und Zineb bestehen.

Ob andere Kartoffelrassen, wie die Rassen (1, 2, 4), (1, 2, 3, 4) usw., die ein großes Kartoffelsorten-Wirtsspektrum besitzen, gegenüber den Fungiziden sich ebenso verhalten, kann nach den vorliegenden Untersuchungen nicht entschieden werden. Wie BLACK (1952) zeigte, sind Rassen mit einem weiten Wirtsspektrum weniger vital als solche mit einem engen. Das legt die Vermutung nahe, daß sie auch eine größere Empfindlichkeit gegenüber Fungiziden besitzen. Aber selbst wenn sie widerstandsfähiger sein sollten, so wäre dies für die Praxis unwichtig, da sie nur selten im Freiland auftreten; bisher wurden sie nur in Zuchtbetrieben isoliert, wo ihre Differenzierungswirte, d. h. Kartoffelsorten mit den Resistenzgenen $R_1R_2R_4$, $R_1R_2R_3R_4$ usw., angebaut werden (SCHICK et al. 1958).

Im Gegensatz zu den Rassen verhalten sich die einzelnen Stämme unterschiedlich gegenüber den Fungiziden. Diese Unterschiede, die sich mit Ausnahme von Kc nur im Sporenkeimtest zeigen, treten sowohl bei Stämmen der Rasse 0 als auch bei solchen der Rasse 4 auf. Der Stamm Kc zeichnet sich durch eine unverhältnismäßig hohe Empfindlichkeit gegenüber beiden Fungiziden aus. Vielleicht ist sie eine Folge seiner Degeneration durch fünfjährige Kultur auf künstlichen Nährböden. Für die anderen Stämme scheidet diese Erklärungsmöglichkeit aus. Deshalb erscheint es nicht ausgeschlossen, daß auch im Freiland Stämme mit verschiedener Empfindlichkeit auftreten können. Inwieweit solche freilich für die Bekämpfung von Wichtigkeit sind, läßt sich aus den vorliegenden Untersuchungen nicht mit Sicherheit entscheiden.

Wichtig ist, daß, genau wie die Rassen, auch die einzelnen Stämme sich gegenüber beiden Fungiziden stets gleichsinnig verhielten. Der Versuchsstamm Kg z. B. war im Sporenkeimtest sowohl gegenüber Ob 21 wie gegenüber Zineb empfindlicher als der Standardstamm Ka.

Demnach ist es wenig wahrscheinlich, etwaige unterschiedliche Erfolge der Bekämpfung mit Ob 21 und Zineb auf unterschiedliche Empfindlichkeit von Rassen und Stämmen zurückführen zu können.

Sucht man nach Anhaltspunkten, die es rechtfertigen, unterschiedliche Eigenschaften der beiden Fungizide zur Erklärung heranzuziehen, so ist vor allem an die unterschiedliche Haufigkeit zu denken, die bei Ob 21 größer ist als bei Zineb (RICH 1954).

Die relativ schlechte Wirkung von Zineb im Bonner Versuch 1957 (s. S. 7) kann durch die geringen Spritzmengen und die weit auseinanderliegenden Behandlungen bedingt sein, die ein weitgehendes Abwaschen der Fungi-

zide in den Zwischenzeiten in diesem extrem feuchten Jahr begünstigten. Ob 21 dagegen, das in gleichen Mengen und zu den gleichen Terminen angewendet wurde, hat wegen seiner besseren Haftfähigkeit und seiner Möglichkeit, sich nach dem Antrocknen wieder zu lösen und weiter auszubreiten (DIMOND und HORSFALL 1955), gut gewirkt. Ebenso haben sich im Parallelversuch in Brühl, in dem größere Fungizidmengen verwendet und die Behandlung noch öfter wiederholt wurde, beide Fungizide gleich wirksam gezeigt. Deshalb müssen in feuchten Jahren und in Gegenden mit hohen Niederschlägen die Kupferpräparate bevorzugt werden; wird trotzdem Zineb verwendet, so muß häufiger gespritzt werden, da es schneller abgewaschen wird (DIMOND und HORSFALL 1955).

Betrachtet man nun noch einmal die in der Einleitung erwähnte Behauptung der Praxis, daß Zineb, im Gegensatz zu den immer gleich gut wirkenden Präparaten, auf Tomate weniger wirksam sei als auf Kartoffel, so könnte man die unsachgemäße Anwendung der Fungizide als einen Grund dafür ansehen. Bedenkt man weiter, daß die beiden Pflanzenarten nicht zur gleichen Zeit angebaut werden, dann wird verständlich, daß sowohl Spritztermine, wie Witterungsbedingungen während der Vegetationsperiode beider Arten verschieden sein müssen. Das erschwert einen Vergleich der Wirksamkeit beider Fungizide auf Kartoffel und Tomate. Bevor daher eine bindende Aussage gemacht werden kann, muß genau geprüft werden, ob der geringere Erfolg von Zineb auf Tomate nicht auf ungünstige Wetterperioden oder eine in Datierung und Häufigkeit unsachgemäße Anwendung des Spritzmittels zurückzuführen ist.

Im Zusammenhang mit den hier kurz angedeuteten Besonderheiten der benutzten Mittel und den aus ihnen abzuleitenden Richtlinien für ihre Anwendung sind noch einige weitere Hinweise über den Zeitpunkt des Auftretens der Tomatenrasse im Freiland von Interesse. *Phytophthora infestans* hat sich, seitdem die Tomate in großem Umfang kultiviert wird, zu einem der gefährlichsten Krankheitserreger dieser Pflanze entwickelt. Die ersten Angaben über die Krankheit sprechen von einem direkten Übergang des Pilzes von der Kartoffel auf die Tomate (zit. bei MILLS 1940). REED hat aber bereits 1912 die Möglichkeit des Vorkommens von Varietäten des Parasiten auf der Tomate angedeutet. Seine Vermutung wurde später von BERG (1926), RÖDER (1935) und SMALL (1938) bestätigt. In diesem Zusammenhang tauchte die Frage nach dem Ursprung und den Überwinterungsmöglichkeiten der Tomatenrasse auf. MILLS gelang es 1940, durch Passagen über Tomatenlaub eine Kartoffelrasse in eine Tomatenrasse umzuwandeln. Damit glaubte er, die Lösung gefunden zu haben: Auch im Freiland entsteht die Tomatenrasse durch Passagen aus der Kartoffelrasse. Einer getrennten Überwinterung der Tomatenrasse bedarf es nicht; sie kann sich in jedem Jahre neu aus der Kartoffelrasse entwickeln.

Alle bisherigen Aussagen über die Tomaten-*Phytophthora* leiden aber darunter, daß sie von einem Befall der Tomate durch *Phytophthora infestans* schlechthin sprechen. Eine solche Verallgemeinerung ist nach meinen Beobachtungen und Isolierungen im Sommer 1957 und 1958 nicht ohne weiteres

zulässig: Die Besiedlung des Wirtes kann — zumindest im Rheinland — in zwei scharf voneinander zu trennenden Formen erfolgen, entweder in einem alleinigen Befall der Früchte oder in einem Befall von Blättern und Früchten. Diese beiden Befallstypen sind in „*Phytophthora*-Jahren" zeitlich eindeutig voneinander zu trennen und werden von zwei, sich in ihrer Wirtsspezifität eindeutig unterscheidenden *Phytophthora*-Rassen hervorgerufen.

Im ersten Fall findet ein direkter Übergang des Parasiten von der Kartoffel auf die Tomate statt, da die Tomatenfrüchte spontan von der Kartoffelrasse befallen werden können (RÖDER 1935). Das bestätigten meine Isolierungen im Sommer 1957 und 1958. 1957 war im Rheinland wegen der überdurchschnittlichen Niederschläge ein ausgesprochenes *Phytophthora*-Jahr. Auf der Kartoffel trat der Pilz Ende Juli sehr stark auf; schon Anfang August begann sein Übergang auf die Tomate in Form der Fruchtfäule. Zu diesem Zeitpunkt konnte ich aus den befallenen Früchten nur die Kartoffelrasse isolieren.

Der zweite Befallstyp, die Schädigung des Laubes, trat erst einige Wochen später, Anfang September, in Erscheinung. Das steht im Einklang mit Beobachtungen von MILLS (1940) und SMALL (1938), die auch ein „verspätetes Auftreten des Befalls der Tomate" beschreiben. Da die Kartoffelrasse das Tomatenlaub nicht zu infizieren vermag, muß der Spätbefall von der Tomatenrasse hervorgerufen sein.

Dagegen konnte 1958 nur eine starke *Phytophthora*-Welle im August festgestellt werden, die ausschließlich die Tomatenfrüchte befiel. Die anschließende Trockenperiode verhinderte eine weitere Ausbreitung der Krankheit durch Neuinfektionen. Das Tomatenlaub blieb gesund, weil die Tomatenrasse nicht zum Zuge kommen konnte, und aus den infizierten Früchten wurde nur die Kartoffelrasse isoliert.

Diese Beobachtungen aus einem feuchten und einem trockenen Jahre sind sicherlich nicht beweiskräftig genug, um eine allgemein gültige These aufzustellen. Sie scheinen aber darauf hinzudeuten, daß im Rheinland der Schaden an Tomaten hauptsächlich durch die Kartoffelrasse hervorgerufen wird, die unmittelbar von der Kartoffel auf die Tomatenfrüchte übergeht. Die Tomatenrasse dagegen erscheint erst im Spätsommer (1957) oder gar nicht (1958). Über das Ausmaß des durch sie verursachten Schadens lassen sich vorerst keine sicheren Angaben machen. Im Spätherbst 1956 isolierte ich aus infizierten Tomatenfrüchten vorwiegend die Tomatenrasse. Demnach kann unter für den Parasiten günstigen Bedingungen auch die Tomatenrasse beträchtliche Schäden an den Tomatenfrüchten hervorrufen. Nach diesen Überlegungen kann also die Kartoffelrasse bei Übergang von Kartoffel auf Tomate nur den ersten Typ des Tomatenbefalls, die Fruchtfäule, hervorrufen. Anders ist es jedoch, wenn das Laub infiziert wird: Dieser Schaden kann nur von der Tomatenrasse erzeugt werden; der Pilz kann also von der Kartoffel aus die vegetativen Teile der Tomate nicht befallen.

Im Widerspruch zu dieser Deutung scheint eine Beobachtung von MILLS (1946) zu stehen. In Gegenden mit starkem Tomatenanbau in Pennsylvanien konnte er aus befallenen Kartoffeln stets die Tomatenrasse isolieren. Da diese

auf Kartoffellaub und -knollen die gleichen Symptome wie die Kartoffelrasse hervorruft (Röder 1935), ist ein solcher Befall von Kartoffeln durch die Tomatenrasse unter besonderen Bedingungen durchaus möglich. Nur dann kann es auch durch unmittelbaren Übergang des Pilzes von der Kartoffel auf die Tomate zu einem Befall der Tomatenblätter kommen. Mit einem solchen Übergang scheint aber in der Bonner Umgebung nicht gerechnet werden zu können; obwohl im Vorgebirge eine sehr intensive Tomatenkultur betrieben wird, ist der Befall der Kartoffeln offenbar, nach eigenen Isolierungen, nur durch die Kartoffelrasse verursacht.

Aus Mills' (1940) gelungenem Versuch über die Umwandlung der Kartoffel- in die Tomatenrasse würde sich auch erklären lassen, daß die Krankheit auf dem Tomatenlaub einige Wochen später erscheint als auf dem Kartoffellaub; diese Zeitspanne wäre für eine schrittweise Anpassung notwendig. Die Ergebnisse von Mills wurden von De Bruyn (1951) bestätigt. In meinen Versuchen gelang eine solche Umwandlung durch Passagen nicht. Über solche Mißerfolge haben auch Black (1952) und Thurston und Eide (1952) berichtet, allerdings bei anderen Rassen des Pilzes. Offenbar erfordert der Passageeffekt bestimmte, noch nicht bekannte Bedingungen. Mills und Peterson (1953) sehen solche im Zustand der Wirtspflanze. Denkbar wäre auch, daß nicht jeder Stamm des Pilzes für solche Änderung geeignet ist.

Der Mißerfolg bei meinen Passageversuchen nach der Methode von Hüttenbach (s. S. 24) läßt sich vielleicht aus einem anderen Zusammenhang erklären. Wie Black (1952) zeigte, überlebt bei einem Gemisch von Kartoffelrassen diejenige, die das kleinste Wirtsspektrum besitzt. In meinen Untersuchungen, bei denen Kartoffellaub oder -knollen mit Sporen der Tomatenrasse und der Kartoffelrasse 0 infiziert worden waren, verschwand die Tomatenrasse vollkommen. Der gleiche Vorgang könnte auch bei den Passagen stattgefunden haben, wenn zwischen der Infektion der Tomatenblätter jeweils eine Übertragung auf Kartoffelknollen eingeschaltet wurde; die von den eventuell aufgetretenen Sporen der Tomatenrasse gebildeten Kolonien könnten dabei von denen der Kartoffelrasse völlig verdrängt worden sein.

Auf Grund der Mißerfolge der Passageversuche und der Stabilität neugebildeter Rassen ist man zu der Ansicht gekommen, daß diese durch Mutation aus schon vorhandenen hervorgehen (Black 1952, Toxopeus 1956). Diese heute vorherrschende Ansicht wird auch von Galiegly und Eichenmüller (1959) geteilt; sie betonen, daß bei Mutationen bestimmte Mutanten häufiger auftreten als andere. So ist die Häufigkeit der Bildung der Rasse 4 besonders groß; darauf beruht auch ihre weite Verbreitung auf den Kulturpflanzen. Als Beitrag zu dieser Frage sei auf die von mir beobachtete spontane Mutation der Rasse 0 in die Rasse 4 hingewiesen.

Diese Vorstellungen sind vorerst nur für die Beziehungen der Kartoffelrassen untereinander entwickelt worden; es scheint aber naheliegend, ähnliche Zusammenhänge auch im Verhältnis von Kartoffel- zu Tomatenrasse anzunehmen.

Das Auftreten der Tomatenrasse unter natürlichen Verhältnissen läßt sich somit theoretisch durch Passageeffekt und spontane Mutationen erklären,

aber Beweise für ihre praktische Verwirklichung fehlen bisher. Deshalb muß noch nach anderen Möglichkeiten gesucht werden, die das Auftreten der Tomatenrasse erklären könnten.

BOYD behauptet 1935, der Pilz könne in milden Wintern auf infizierten Tomatenstauden überdauern. Für die Bonner Verhältnisse erscheint diese Möglichkeit wenig wahrscheinlich, da die Tomatenpflanzen spätestens im November durch die ersten Fröste zum Absterben gebracht werden.

BOYD (1935) konnte außerdem *Phytophthora infestans* als Myzel in Tomatensamen feststellen und leitete daraus die Möglichkeit der Samenübertragbarkeit der Tomatenrasse ab. Diese Beobachtung steht im Gegensatz zu der von REED (1912), der den Pilz im Samen nicht nachweisen konnte.

Denkbar wäre auch eine Überwinterung der Tomatenrasse in Kartoffelknollen. Obwohl ich von Kartoffellaub und -knolle nur die Kartoffelrasse isolieren konnte, kann ein Übergang der Tomatenrasse von der Tomate auf Spätkartoffel doch nicht ausgeschlossen werden. Hier könnte sie zu einem geringen Prozentsatz auch eine Knolleninfekion verursachen. Die aus diesen befallenen Knollen im nächsten Jahre gebildeten Stauden könnten als Primärherde für die Tomateninfektion dienen; ihre relativ geringe Anzahl würde auch die lange Anlaufzeit bis zu einem ausgeprägten, späteren Laubbefall der Tomate erklären.

Diese Überlegungen können für das Rheinland und solche Gegenden gelten, in denen Anbau beider Wirtspflanzen und klimatische Faktoren etwa den Verhältnissen des Rheinlands entsprechen. In anderen Klimaten, z. B. in wärmeren Ländern, in denen sich der Aufwuchs von Tomate und Kartoffel längere Zeit überschneidet und die optimalen Bedingungen für die Entwicklung des Pilzes in andere Wachstumsphasen des Wirtes — z. B. Sämlingsstadium der Tomate (YOUNG 1946, HARRISON 1947) — fallen, dürfte auch der Lebenszyklus der Tomatenrasse ein anderer sein.

Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit sollte klären, ob die behauptete, im Vergleich mit Kupferpräparaten, geringere Wirkung von Zineb auf *Phytophthora infestans* an Tomate mit bestimmten Rassen des Pilzes in Verbindung zu bringen sei.

1. In Feldversuchen konnte eine angebliche unterschiedliche Wirkung von organischen und anorganischen Fungiziden in der Regel nicht bestätigt werden. Der geringere Erfolg der organischen Fungizide in einem Versuch war auf unsachgemäße Anwendung bei außerordentlich feuchter Witterung zurückzuführen.

2. Zweijährige Isolierungen ergaben, daß in der Umgebung von Bonn der Befall von Tomatenfrüchten hauptsächlich durch die Kartoffelrassen 0 und 4 hervorgerufen wurde, die das Tomatenlaub nicht angreifen können. Sie treten wesentlich früher auf als die Tomatenrasse, die Tomatenlaub und Früchte befallen kann.

3. Im Pflanzentest erwiesen sich mit Ausnahme von Stamm Kc (Rasse 0) alle geprüften Stämme der Kartoffelrassen 0 und 4 und der Tomatenrasse gegenüber Kupferoxychlorid und Zineb als gleich empfindlich.

4. Der empfindliche Sporenkeimtest zeigte gesicherte Unterschiede zwischen einzelnen Stämmen, Unterschiede zwischen den Rassen ergaben sich nicht. In keinem Fall war jedoch die Empfindlichkeit gegenüber Kupferoxychlorid größer als gegenüber Zineb.

5. Um zu klären, ob etwa eine Beziehung zwischen Pathogenität und Empfindlichkeit gegenüber Fungiziden besteht, wurde versucht, Rassenänderungen experimentell auszulösen. Sie waren jedoch weder durch Passageeffekt noch durch induzierte Mutationen zu erreichen.

6. Eine spontane Änderung der Pathogenität eines Stammes von der Kartoffelrasse 0 zur Kartoffelrasse 4 brachte keine Änderung der Empfindlichkeit gegenüber Kupferoxychlorid mit sich.

Zur weiteren Deutung der Zusammenhänge sind Beobachtungen über das Auftreten der Kartoffel- und Tomatenrasse in der Bonner Umgebung ergänzt und diskutiert worden.

Summary

The object of the present work was to determine whether the inferiority of Zineb in comparison with copper preparations in its effect on *Phytophthora infestans* on tomatoes could be connected with particular races of the fungus.

1. In field experiments the reported difference in efficacy between organic and inorganic fungicides could not as a rule be confirmed. The lower effectiveness of the organic fungicides in one experiment could be explained by the inappropriate application of them in exceptionally wet weather.

2. Two-year isolations showed that in the vicinity of Bonn infection of tomato fruits is caused principally by potato races 0 and 4, which are not able to attack tomato foliage. They occur considerably earlier than the tomato races, which can attack both tomato foliage and fruits.

3. In a plant test all strains of potato races 0 and 4 and of the tomato races proved equally susceptible to copper oxychloride and Zineb, with the exception of strain Kc (race 0).

4. The more sensitive spore germination test showed significant differences between individual strains but there were no differences between the races. In no case however was the sensitivity to copper oxychloride greater than that to Zineb.

5. In order to determine whether a relationship existed between pathogenicity and the susceptibility to fungicides, an attempt was made to induce

race changes experimentally. They could not be produced however either by passage effect or by induced mutation.

6. A spontaneous change of pathogenicity from potato race 0 to potato race 4 did not bring with it any change in sensitivity to copper oxychloride.

For a further clarification of the interrelationships more extensive observations have been made on the occurrence of the potato and tomato race in the environs of Bonn and the results are discussed.

Literaturverzeichnis

American Phytopathological Society. Committee on standardization of fungicidal tests, 1943: The slide-germination method of evaluating protectant fungicides. Phytopathology **33**, 627—632.

— —, 1947: Test tube dilution technic for use with the slide-germination method of evaluating protectant fungicides. Phytopathology **37**, 354—356.

BERG, A., 1926: Tomato late blight and its relation to late blight of potato. West Virginia Agric. Exp. Sta. Bull. **205**, 3—30.

BLACK, W., 1949: Resistance to Blight („*Phytophthora infestans*") in Potatoes: Comparison of A and B Strains. Proc. Royal Soc. Edinbg., B **63**, 290—301.

— —, 1952: A genetical basis for the classification of strains of *Phytophthora infestans*. Proc. Roy. Soc. Edinb. B **65**, 36—51.

— —, C. MASTENBROEK, W. R. MILLS and L. C. PETERSON, 1953: A proposal for an international nomenclature of races of *Phytophthora infestans* and of genes controlling immunity in *Solanum demissum* derivatives. Euphytica **2**, 173—179.

BLUMER, S., und J. KUNDERT, 1951: Methoden der biologischen Laborprüfung von Kupferpräparaten. Phytopath. Z. **17**, 161—199.

BOYD, O. C., 1935: Evidence of the seed-born nature of late-blight (*Phytophthora infestans*) to tomatoes. Phytopathology **25**, 7.

DE BRUYN, H. L. G., 1952: Pathogenic differentiation in *Phytophthora infestans* (Mont.) De Bary. Phytopath. Z. **18**, 339—359.

DIMOND, A. E., and J. G. HORSFALL, 1955: Fifty years of fungicides. Ann. Appl. Biol. **42**, 282—287.

FINNEY, D. J., 1952: Probit analysis. Cambridge.

GALLEGLY, M. E., 1952: Physiologic races of the tomato late blight fungus. Phytopathology **42**, 461—462.

— —, and J. J. EICHENMÜLLER, 1959: The spontaneous appearance of the potato race 4 character in cultures of *Phytophthora infestans*. Amer. Potato J. **36**, 45—51.

— —, and M. E. MARVEL, 1955: Inheritance of resistance to tomato race 0 of *Phytophthora infestans*. Phytopathology **45**, 103—109.

HARONSKA, G., 1958: Dosierung im Pflanzen- und Vorratsschutz. Bonn.

HARRISON, A. L., 1947: The relation of weather to epiphytotics of late blight on tomatoes. Phytopathology **37**, 533—538.

Henniger, H., 1959: Versuche zur Kultur verschiedener Rassen von *Phytophthora infestans* (Mont.) De Bary auf künstlichen Nährböden. Phytopath. Z. **34**, 285—306.

Hüttenbach, H., 1951: Untersuchungen über die pathogenen Eigenschaften zweier Herkünfte des Erregers der Kraut- und Knollenfäule, *Phytophthora infestans* De Bary. Diss. Univ. Bonn.

McCallan, S. E. A., R. H. Wellman and F. Wilcoxon, 1941: An analysis of factors causing variation in spore germination tests of fungicides. III. Slope of toxicity curves, replicase tests, and fungi. Contr. Boyce Thompson Inst. **12**, 49—77.

— —, and — —, 1943: A greenhouse method of evaluating fungicides by means of tomato foliage diseases. Contr. Boyce Thompson Inst. **13**, 93—134.

Melhus, I. E., 1916: Infection and resistance studies of *Phytophthora infestans* on the tomato. Phytopathology **6**, 107.

Miller, H. J., 1949: Modification of the slide-germination method of evaluating fungicides including the use of *Venturia inaequalis* and *Phytophthora infestans*. Phytopathology **39**, 245—249.

Mills, W. R., 1940: *Phytophthora infestans* on tomatoes. Phytopathology **30**, 830—839.

— —, 1947: Tomato race of late blight overwintering on potato tubers in Pennsylvania. Plant Dis. Reptr. **31**, 230.

— —, and L. C. Peterson, 1952: The development of races of *Phytophthora infestans* (Mont.) De Bary on potato hybrids. (Abs.) Phytopathology **42**, 26.

Orth, H., und H. Lehmann, 1935: Über Degenerationserscheinungen bei *Phytophthora infestans*. Züchter **7**, 12—16.

Peterson, L. C., and W. R. Mills, 1953: Resistance of some American potato varieties to the late blight of potatoes. Amer. Pot. J. **30**, 65—70.

Prillieux, M., 1888: Expérience sur le traitement de la maladie de la pomme de terre. Compt. Rend. Acad. Sci., Paris, **107**, 447—448.

Reddick, D., and W. R. Mills, 1938: Building of virulence in *Phytophthora infestans*. Amer. Pot. J. **15**, 29—34.

Reed, H. S., 1912: Does *Phytophthora infestans* cause tomato blight? Phytopathology **2**, 250—252.

Rich, S., 1954: Dynamics of deposition and tenacity of fungicides. Phytopathology **44**, 203—213.

Röder, K., 1935: Untersuchungen über die *Phytophthora*-Krankheit (*Phytophthora infestans*) der Tomate. Unter besonderer Berücksichtigung der biologischen Spezialisierung des Erregers. Phytopath. Z. **8**, 589—614.

Schick, R., 1932: Über das Verhalten von *Solanum demissum, Solanum tuberosum* und ihren Bastarden gegenüber verschiedenen Herkünften von *Phytophthora infestans*. Züchter **4**, 233—237.

— —, E. Schick und M. Haussdörfer, 1958: Ein Beitrag zur physiologischen Spezialisierung von *Phytophthora infestans*. Phytopath. Z. **31**, 225—236.

Schicke, P., 1955: Über eine einfache Versuchsanstellung der Fungizid-Teste mit *Phytophthora infestans* (Mont.) De Bary. Nachr.Bl. Dtsch. Pfl.Schutzd., Braunschweig, **7**, 120—122.

Schwinghamer, E. A., 1959: Induced mutations of pathogens for the study of host-parasite interactions. In: Plant pathology, problems and progress 1908—1958. The University of Wisconsin Press, Madison.

Small, T., 1938: The relation between potato blight and tomato blight. Ann. Appl. Biol. **25**, 271—276.

Thurston, H. D., and C. J. Eide, 1952: The appearance and survival of new races of *Phytophthora infestans*. (Abs.) Phytopathology **42**, 481—482.

Toxopeus, H. J., 1956: Reflections on the origin of new physiologic races in *Phytophthora infestans* and the breeding for resistance in potatoes. Euphytica **5**, 221—237.

Wilson, J. B., and M. E. Gallegly, 1955: The interrelationship of potato and tomato races of *Phytophthora infestans*. Phytopathology **45**, 473—476.

Yarwood, C. E., 1943: The function of lime and host leaves in the action of bordeaux mixture. Phytopathology **33**, 1146—1156.

Young, P. A., 1946: Late blight of tomatoes in East Texas at transplanting time. Phytopathology **36**, 389—391.

From Plant Pathology Laboratory, Faculty of Agriculture,
Nagoya University, Anjo, Aichi-Ken (Japan)

The mode of action of some antibiotics in their inhibitory effect on tobacco mosaic virus multiplication[1])

By

T. Hirai and T. Shimomura

With 6 figures

INTRODUCTION

Among the antiviral substances already reported, antibiotics occupy an important position. Gray has shown that noformicin and later cytovirin are effective in inhibiting the multiplication of tobacco mosaic virus (TMV) and southern bean mosaic virus (Gray 1955, 1957). Recently mitomycin C, actidione, and several other antibiotics were found to give the same inhibition on TMV (Lindner, Kirkpatrick and Weeks 1959; Shimomura and Hirai 1959). However, the mode of action of these antibiotics remains obscure, although cytovirin was reported to reduce the host root growth rather than to inhibit the formation and development of the virus (Bergmann 1958; Wittmann 1958). Antimetabolites, for example, thiouracil, caused the lower level of nucleic acid in non-infected tobacco leaves, and thus simultaneously reduced the relative virus titer (Porter and Weinstein 1957, 1960). It is a well-known fact that thiouracil, azaguanine and recently fluorouracil, incorporate into the virus nucleic acid (Jeener and Rosseels 1953; Matthews 1954; Gordon and Staehelin 1959). This report mainly is concerned with the possible relationship between the inhibitory effect caused by some antibiotics, on the nucleic acid synthesis of non-infected leaves and on the virus multiplication.

[1]) Contribution No. 53, Plant Pathology Laboratory, Nagoya University. This work was supported by a grant in aid from the Scientific Research Expenditure of the Ministry of Education of Japan.

MATERIALS AND METHODS

The detached leaf-culture method was introduced (HIRAI et al. 1957). Fully expanded leaves were removed from tobacco plants (*Nicotiana tabacum* L.), variety Bright Yellow mostly, or variety Turkish (Samsun) for a special use. They were inoculated with the common strain of TMV found in Japan and were punched into discs. One set of samples consisted of 15 to 20 discs (12 mm diam., wet weight 500 to 600 mg) cut from a half-leaf, while other discs cut from the opposite half of the same leaf usually served as control. These discs were floated on distilled water at constant temperature of 25 °C under continuous illumination from fluorescent lamps. Sometimes half-strength Vickery's solution was used instead of distilled water (COMMONER, SCHIEBER and DIETZ 1953). Mitomycin C (MC), and naramycin (NM, cycloheximide, actidione analogue) and its derivatives, were supplied by Kyowa Fermentation Industry, Ltd., and Tanabe Pharmaceutical Industries, Ltd., respectively.

Nucleic acids concentrations of the leaf discs were determined by the modified method of OGUR and ROSEN (1950). Namely, after extracting the acid soluble and lipid phosphorus compounds, ribonucleic acid (RNA) was obtained by incubating the precipitate with 1 n $HClO_4$ at 8 °C for 18 hours. Then the value for deoxyribonucleic acid (DNA) was obtained by heating the residue that remained with 1 n $HClO_4$ at 70 °C for 20 min. Unless otherwise stated, the value for the total nucleic acid will be shown. To test the ^{32}P incorporation, inoculated and non-inoculated leaf-discs were incubated for 5 to 6 days in distilled water containing 200 to 300 μc/l of ^{32}P. Then the leaf homogenates of both the inoculated and non-inoculated leaf-discs and the virus component of the inoculated leaf-discs, the latter being isolated by the ammonium sulphate-procedure (SHIMOMURA, NISHIKAWA and HIRAI 1957), were fractionated into nucleic acid by employing SCHNEIDER's method (SCHNEIDER 1945), and the radioactivity in this fraction was measured together with the colorimetric determination of its phosphorus concentration (ALLEN 1940). The rate of the TMV synthesis was estimated by the method of BANCROFT and CURTIS (1957).

RESULTS

1. The inhibition of nucleic acid synthesis by mitomycin C

It has been shown that MC, an anticarcinomatous antibiotic found in Japan, inhibits TMV multiplication (SHIMOMURA and HIRAI 1959). An experiment was designed to determine the experimental conditions under which MC records most effective inhibition, and to investigate the effect of MC on the nucleic acid synthesis of non-infected leaves. The results, 6 days after incubation, are shown in Fig. 1. It was evident that MC had its maximum

inhibitory activity at a concentration of 25 ppm, although its rate varied in accordance with the tobacco varieties that were used. In either case, whether the discs were floated on distilled water or on Vickery's solution, the inhibitory activity always increased when the Bright Yellow variety, rather than Turkish variety, tobacco leaf was used. It attracted attention that MC of sufficient concentration to be effective in inhibiting virus multiplication, concomitantly reduced the nucleic acid concentration of the leaves when it was applied to non-infected discs, and further, that the rate of reduction became almost negligible as the concentration of MC was lowered to the point where it had little influence in inhibiting virus multiplication. Thus, some correlation exists between the inhibitory activity of MC on virus multiplication and on nucleic synthesis in non-infected leaves.

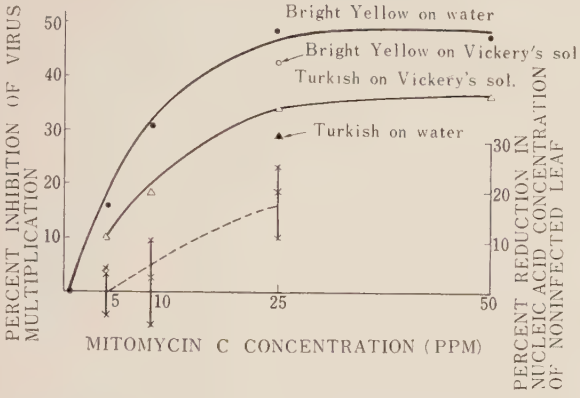

Fig. 1. The relation between the inhibitory effect caused by the different concentrations of mitomycin C (MC), on the TMV multiplication (solid line, average of 3 repetitions) and on the nucleic acid synthesis of non-infected leaves (broken line, 3 independent data). The infected leaf-discs were floated on distilled water or on VICKERY's solution containing MC. The non-infected leaf-discs were floated on distilled water containing MC

Changes in the nucleic acids concentrations during incubation of non-infected discs treated with MC are presented in Fig. 2. It was apparent that the RNA concentration of non-treated discs showed a decline and MC exhibited a specific inhibition on the RNA synthesis, but no inhibition on the DNA synthesis.

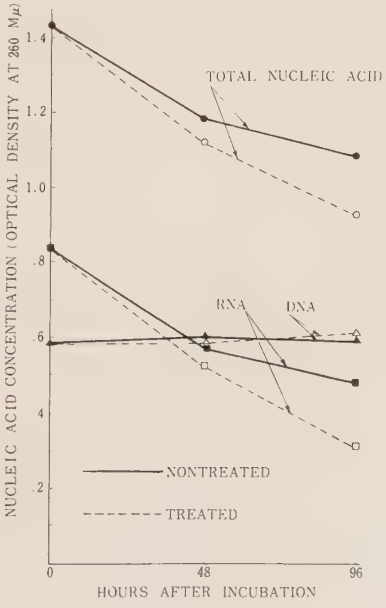

Fig. 2. The time-course of the changes in the nucleic acids concentrations during incubation in distilled water of the non-infected leaf-discs treated with 25 ppm mitomycin C

2. The inhibition by MC or NM on the ^{32}P incorporation into the nucleic acid fraction of leaf-discs

Inoculated and non-inoculated discs were placed on an aqueous solution containing ^{32}P. Both inoculated and non-inoculated discs were divided into 3 groups respectively. The first group was transferred to a dish containing 25 ppm MC, the second group was transferred to a dish containing 2.5 ppm NM, while the third group was used as the control by being transferred to a dish containing distilled water. After 5 days' incubation, nucleic acid fraction was obtained from the inoculated discs, non-inoculated discs, and the virus component that was derived from the inoculated discs. The phosphorus concentration of, and the ^{32}P incorporation into, this fraction are illustrated in Figs. 3 and 4. The data obtained show that MC reduced the concentration of nucleic acid phosphorus of infected and non-infected discs as well as that of the virus component, and inhibited the ^{32}P incorporation into the nucleic acid of all three samples. The action of NM, however, differed somewhat from that of MC. Both in the infected and non-infected discs, the concentration of the nucleic acid phosphorus in NM-treated discs was higher than that in non-treated discs, despite the fact that NM showed a high inhibitory effect on the production of virus nucleic acid. A possible explanation will be given later. The ^{32}P incorporation into the nucleic acid

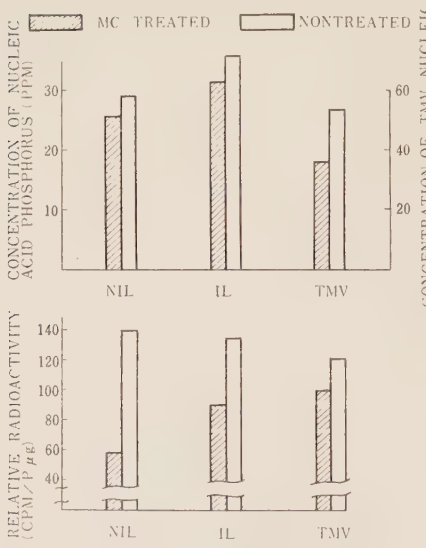

Fig. 3. The effect of 25 ppm mitomycin C (MC) on the phosphorus concentration of, and the ^{32}P incorporation into, the nucleic acid fraction of the non-infected leaf (NIL), the infected leaf (IL), and the TMV component (TMV)

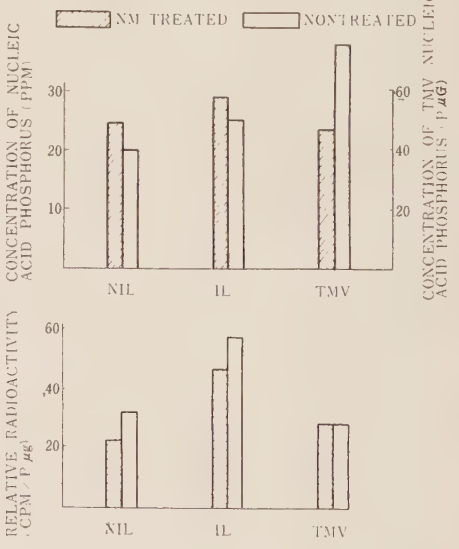

Fig. 4. The effect of 2.5 ppm naramycin (NM) on the phosphorus concentration of, and the ^{32}P incorporation into, the nucleic acid fraction of the non-infected leaf (NIL), the infected leaf (IL), and the TMV component (TMV)

of infected or non-infected discs was inhibited by NM-treatment. From this, it appears that nucleic acid produced under the influence of NM remains, though large in amounts, in a stable and unmetabolized state.

3. The inhibitory activity of NM and its derivatives on the multiplication of TMV and the effect of them on the nucleic acids syntheses of non-infected discs

Actidione and its analogues, naramycin and fermicidin, have been shown to inhibit TMV multiplication at fairly diluted concentrations (SHIMOMURA and HIRAI 1959). NM and its derivatives were tested for their effect on the inhibition of TMV multiplication. As is shown in Table 1, acetate, oxim,

Table 1

The effect of naramycin (NM) derivatives on the rate of TMV multiplication

Preparation No.[1])	Concentration (ppm)	Change in the rate of TMV multiplication	Tissue injury
NM-104	10	— 37 ± 4.3[2])	none
NM-105	50	— 30 ± 5.2	none
NM-106	< 50	— 50 ± 2.6	none
NM-110	< 50	— 6 ± 4.0	none
NM-124	10	— 2 ± 9.0	browning
NM-101	50	+ 21 ± 5.5	none
NM-1033	50	+ 3 ± 4.1	none
NM-301	50	+ 5 ± 0.7	none

[1]) NM-104, NM acetate; NM-105, NM oxim; NM-106, NM semicarbazone; NM-110, NM-3,4-dichlorobenzoate; NM-124, NM phenylmercurate; NM-101, dehydro NM; NM-1033, anhydro NM thiosemicarbazone; NM-301, p-acetyl-aminobenzal-cyclohexanonethiosemicarbazone.

[2]) Figures represent percentages of increase (+) or decrease (—) in the TMV multiplication and average percentages of deviation from mean.

Table 2

The increase by naramycin (NM) or its derivatives of the total nucleic acid concentration of the non-infected discs as compared with the concentration of the non-treated discs after four days' incubation in distilled water

NM or its derivatives	Concentration (ppm)	Increased percentages of the nucleic acid concentration
NM	5	13
NM acetate	10	25
NM oxim	50	12
NM semicarbazone	50	10

and semicarbazone derivatives of NM were as effective as the parent material, whereas the other derivatives produced no inhibition.

A specific action of NM is the fact that it does not reduce the nucleic acid concentration of non-infected discs. This action was further investigated through the use of NM derivatives and the results in Table 2 were obtained. It was demonstrated that the discs treated with NM, or any of its derivatives, that had an inhibitory effect on TMV multiplication, had a much higher concentration of nucleic acid after 4 days' incubation than the incubated but non-treated discs did. The time-course of changes in the nucleic acids concentrations for a 96-hour period is shown in Figs. 5 and 6. These results indicate that, in NM-treated discs, the concentration of nucleic acid, especially that of RNA, decreases at a slower rate than that in non-treated discs and NM acetate had a tendency to rather stimulate the RNA synthesis at an early stage of incubation.

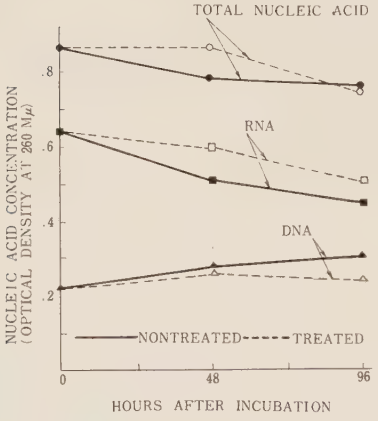

Fig. 5. The time-course of the changes in the nucleic acids concentrations during incubation in distilled water of the non-infected leaf-discs treated with 2.5 ppm naramycin

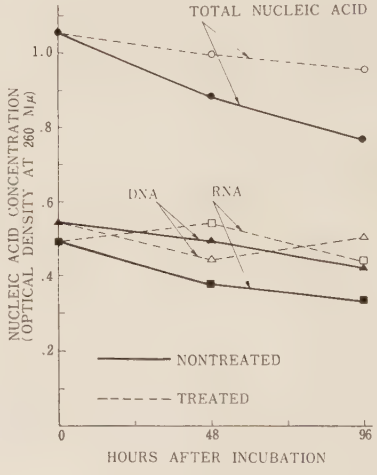

Fig. 6. The time-course of the changes in the nucleic acids concentrations during incubation in distilled water of the non-infected leaf-discs treated with 10 ppm naramycin acetate

DISCUSSION

MC was demonstrated to inhibit the bacterial DNA synthesis, but not to interfere with its RNA synthesis (SHIBA et al. 1959). In non-infected plant leaves, the RNA concentration during incubation was greatly reduced by the MC treatment as compared with the reduction by non-treatment. This fact reflects the inhibition of the RNA, but not of the DNA, syntheses by MC (Fig. 2). MC also inhibited the ^{32}P incorporation into the nucleic acid of the leaf-discs, suggesting that this nucleic acid that was produced may be lower in turn-over rate. Although the pathway of the virus synthesis

that is broken by MC can not be ascertained at present, the inhibition of the RNA synthesis may be closely related to the reduction in the amount of viral RNA. This was further proved by the fact that the limiting concentration of MC capable of inhibiting virus multiplication was identical with that inhibiting the RNA synthesis in non-infected leaves (Fig. 1). Thiouracil reduced the RNA concentration of intact plants and consequently can suppress virus formation (Porter and Weinstein 1957, 1960). From this, a working hypothesis predicting that the antiviral substances must react in some way to inhibit the RNA synthesis of the host leaves may become acceptable.

However, the results obtained by NM-treatment seemed to contradict the above hypothesis. As is apparent from the time-course during incubation, the RNA concentration of the discs treated with NM or its derivatives did not decrease as much as the decrease noted in the non-treated but incubated discs; however, the RNA concentration of the discs treated with a certain derivative of NM sometimes tended to increase. Under similar conditions, the protein nitrogen level of the leaf-discs subjected to NM-treatment after incubation in distilled water showed a larger value of decrease than that of the non-treated discs (Hayashi and Hirai in press). Since NM inhibits the ^{32}P incorporation into the nucleic acid of the leaf-discs, these results suggest that NM protects or suppresses the decomposition of nucleic acid, leaving it in a metabolically inert state. In yeast cells actidione inhibited the DNA synthesis (Kerridge 1958). Thus, the mechanism of the action of these cycloheximide is different according to the organisms tested.

Reddi (1959) demonstrated that the number of TMV rods in the top leaves, where the RNase activity was lower, was comparatively few as compared with the bottom leaves. Goldin (1959) also stated that the TMV was synthesized by utilizing purine and pyrimidine bases, such as adenine and uracil. In these experiments of culturing leaf-discs in distilled water, the viral RNA would be synthesized from the decomposition products of the leaf nucleic acid; therefore, it seems that the inhibition of virus multiplication by NM partly would be due to an insufficient amount of substrates for virus synthesis. NM or its derivatives reduced the rate of decomposition, or stimulated the synthesis, of leaf RNA, thus the concentration of the resultant substrates will become deficient, simultaneously resulting in a decrease in the amount of virus produced. Samborski et al. (1958) have reported similar decreases in substrates available for rust infection in resistant wheat leaves floated on benzimidazole.

Summary

The mode of action of some antibiotics that were reported to have an inhibitory action on tobacco mosaic virus (TMV) multiplication was investigated by means of the detached leaf discs-culture method. Mitomycin C (MC) inhibited TMV production in tobacco leaf-tissues most effectively at

a concentration of 25 ppm, and at this concentration, MC was also effective in inhibiting the RNA synthesis of non-infected tobacco leaf; however, it did not inhibit the DNA synthesis. Naramycin (NM, actidione analogue) and its derivatives (acetate, oxim, and semicarbazone) produced the same inhibition at fairly diluted concentrations; however, these antibiotics did not reduce the RNA concentration of non-infected leaf-discs as compared with non-treated leaf-discs after 4 days' incubation in distilled water. NM acetate had a rather stimulating effect on the RNA synthesis. Both MC and NM inhibited the ^{32}P incorporation into the nucleic acid fraction of infected and non-infected leaves and the virus component. From these results, it was postulated that the mode of action of NM differed from that of MC, and that NM and its derivatives may probably suppress the decomposition of RNA in a leaf. Therefore, the substrates that produced the virus multiplication will correspondingly become deficient by NM-treatment, thus decreasing the amount of virus synthesized.

Zusammenfassung

Der Wirkungsmechanismus der verschiedenen, auf die Vermehrung von Tabakmosaikvirus hemmend wirkenden Antibiotika wurde durch ein Experiment, indem ein isoliertes Tabakblatt in einer Glasschale kultiviert wurde, untersucht. Mitomycin C (MC) hat die TMV-Vermehrung im Blattgewebe in der Konzentration 25 ppm gehemmt. In derselben Konzentration war es für die Hemmung der RNS-Synthese im nicht infizierten Blatte effektiv, doch nicht für die der DNS-Synthese.

Naramycin (NM, Actidion-Analogon) und seine Derivate (Acetat, Oxym und Semicarbazon) haben in ziemlich verdünnter Konzentration dieselbe Hemmung verursacht. Dieses Antibiotikum ließ den RNS-Gehalt des nicht infizierten Blattes nach 4 Tagen Inkubation im Vergleich mit dem unbehandelten Blatte nicht abnehmen. NM-Acetat hat vielmehr zur RNS-Synthese einen stimulierenden Effekt gehabt. Sowohl MC als auch NM haben die Inkorporation von ^{32}P in die Nucleinsäurefraktion des infizierten, des nicht infizierten Blattes und der Viruskomponente gehemmt. Aus diesen Resultaten wurde geschlossen, daß der Wirkungsmechanismus von NM anders als der von MC sei, und daß NM und dessen Derivate vielleicht die RNS-Zerlegung im Blatte unterdrücken. Es mag wohl durch die Behandlung von NM an dem zur Virussynthese erforderlichen Substrat gemangelt und die Verminderung des gebildeten Virusgehaltes zur Folge gehabt haben.

Literature cited

ALLEN, R. J. L., 1940: The estimation of phosphorus. Biochem. J. **34**, 858—865.

BANCROFT, J. B., and R. W. CURTIS, 1957: A simple method using trichloroacetic acid for estimating tobacco mosaic virus concentration. Phytopathology **47**, 79—82.

Bergmann, L., 1958: Über den Einfluß von Thiouracil und Cytovirin auf das Wachstum und die Virusproduktion isolierter Tomatenwurzeln. Phytopath. Z. **34**, 209—220.

Blumauerová, M., and J. Stárka, 1959: Reversal of antibiotic action of cycloheximide (Actidione) by bivalent metal ions. Nature **183**, 261.

Commoner, B., D. L. Schieber and P. M. Dietz, 1953: Relationship between tobacco mosaic virus biosynthesis and the nitrogen metabolism of the host. J. Gen. Physiol. **36**, 807—830.

Gordon, M. P., 1959: The utilization of exogenous adenine and uracil for the synthesis of tobacco mosaic virus nucleic acid. Virology **9**, 492—494.

— —, and M. Staehelin, 1959: Studies on the incorporation of 5-fluorouracil into a virus nucleic acid. Biochim. et Biophys. Acta **36**, 351—361.

Gray, R. A., 1955: Activity of an antiviral agent from *Nocardia* on two viruses in intact plants. Phytopathology **45**, 281—285.

— —, 1957: Inhibition of local-lesion and systemic plant virus infections with a new antiviral agent, cytovirin. Phytopathology **47**, 522 (Abstr.).

Hayashi, Y., and T. Hirai: Changes in nitrogen metabolism induced by some antiviral substances in tobacco mosaic virus-infected tobacco leaf discs. Virus (Kyoto) (in press).

Hirai, T., et al., 1957: Studies on the chemotherapy for plant virus diseases. I. Screening tests of the new antibiotics for their effect on TMV multiplication in tobacco leaf. Ann. Phytopathol. Soc. Japan **22**, 70—74 (in Japanese with English summary).

Jeener, R., and J. Rosseels, 1953: Incorporation of 2-thiouracil-S^{35} in the ribose nucleic acid of tobacco mosaic virus. Biochim. et Biophys. Acta **11**, 438.

Kerridge, D., 1958: The effect of acti-dione and other antifungal agents on nucleic acid and protein synthesis in *Saccharomyces carlsbergensis*. J. Gen. Microbiol. **19**, 497—506.

Lindner, R. C., H. C. Kirkpatrick and T. E. Weeks, 1959: Comparative inhibition of virus multiplication by certain types of chemicals. Phytopathology **49**, 802—807.

Matthews, R. E. F., 1954: Effects of some purine analogues on tobacco mosaic virus. J. Gen. Microbiol. **10**, 521—532.

— —, and C. H. Proctor, 1956: Influence of aliphatic organic acids and metal ions on numbers of local lesions produced by a tobacco necrosis virus. J. Gen. Microbiol. **14**, 366—370.

Ogur, M., and G. Rosen, 1950: Nucleic acids of plant tissues. I. Extraction and estimation of desoxypentose nucleic acid and pentose nucleic acid. Arch. Biochem. **25**, 262—276.

Porter, C. A., and L. H. Weinstein, 1957: Biochemical changes induced by thiouracil in cucumber mosaic virus-infected and noninfected tobacco plants. Contribs. Boyce Thompson Inst. **19**, 87—106.

— —, and — —, 1960: Altered biochemical patterns induced in tobacco by cucumber mosaic virus infection, by thiouracil, and by their interaction. Contribs. Boyce Thompson Inst. **20**, 309—315.

Reddi, K. K., 1959: Studies on tobacco leaf ribonuclease. III. Its role in the synthesis of tobacco mosaic virus nucleic acid. Biochim. et Biophys. Acta **33**, 164—169.

Samborski, D. J., F. R. Forsyth and C. Person, 1958: Metabolic changes in detached wheat leaves floated on benzimidazole and the effect of these changes on rust reaction. Can. J. Botany **36**, 591—601.

Schneider, W. C., 1945: Phosphorus compounds in animal tissues. I. Extraction and estimation of desoxypentose nucleic acid and of pentose nucleic acid. J. Biol. Chem. **161**, 293—303.

SHIBA, S., A. TERAWAKI, T. TAGUCHI and J. KAWAMATA, 1959: Selective inhibition of formation of deoxyribonucleic acid in *Escherichia coli* by mitomycin C. Nature **183**, 1056—1057.

SHIMOMURA, T., Y. NISHIKAWA and T. HIRAI, 1957: Studies on the chemotherapy for plant virus diseases. II. Screening tests of the new antibiotics by leaf-spraying method. Ann. Phytopathol. Soc. Japan **22**, 260—264 (in Japanese with English summary).

— —, and T. HIRAI, 1959: Studies on the chemotherapy for plant virus diseases. IV. Effect of the antibiotics on the multiplication of tobacco mosaic virus. Ann. Phytopathol. Soc. Japan **24**, 93—96 (in Japanese with English summary).

WITTMANN, H. G., 1958: Untersuchungen über die Wirkung des Cytovirins auf Virusvermehrung und Wirtswachstum. Phytopath. Z. **34**, 221—227.

Aus dem Institut für spezielle Botanik
der Eidgenössischen Technischen Hochschule in Zürich

Zur phytotoxischen Wirksamkeit der Enniatine[1])

Von

E. Gäumann, St. Naef-Roth und H. Kern

Mit 2 Abbildungen

Fusarien bilden in vitro neben einer Reihe von hauptsächlich phytotoxischen Stoffwechselprodukten wie Lycomarasmin, Lycomarasminsäure, Fusarinsäure, Fusarubin und Javanicin (Gäumann und Naef 1959, Gäumann 1957, Kugler 1959) auch die in erster Linie antibakteriell wirksamen Enniatine (Gäumann et al. 1950). Aus Myzelien von *Fusarium oxysporum* Lamb. et Fautr. ließ sich das in vitro gegenüber Mycobakterien stark wirksame Enniatin A ($C_{24}H_{42}O_6N_2$; Smp. 121 bis 122°), aus Myzelien von *F. oxysporum* Schlecht. var. *auranthiacum* (Lk.) Wr. und *F. avenaceum* (Lk.) Wr. Enniatin B ($C_{22}H_{38}O_6N_2$; Smp. 173 bis 175 °C) isolieren (Nager 1948). Ferner fanden Guérillot-Vinet et al. (1950) im Myzel von *Gibberella baccata* (Wallr.) Sacc. eine weitere antibiotisch wirksame Substanz, das Baccatin A (Smp. 135 °C) von bisher unbekannter Konstitution.

Im Rahmen einer Untersuchung über die Bildung von Welketoxinen durch Fusarien fanden wir in Kulturfiltraten von *G. baccata* (Wallr.) Sacc. einen stark welkeaktiven Stoff, der nach Reinigung des Rohextraktes durch Chromatographie an Aluminiumoxyd zusätzlich antibakterielle Wirksamkeit aufwies und in der Folge durch G. Hall (1960) als Baccatin A identifiziert werden konnte. Nach genaueren chemischen Untersuchungen, IR-Spektroskopie und Herstellung zahlreicher Abbauprodukte zeigte Hall, daß Baccatin A keine einheitliche Substanz ist, sondern ein sehr schwer trennbares Gemisch der Enniatine B und A im Verhältnis von etwa 2,5 : 1.

Das Toxin, das wir aus Kulturlösungen von *G. baccata* isolierten, ist also trotz ganz anderer Züchtungs- und Isolierungsbedingungen identisch mit Baccatin A, und dieses wiederum stellt ein Gemisch der schon lange bekannten

[1]) Die vorliegende Arbeit wurde durch den Schweizerischen Nationalfonds zur Förderung wissenschaftlicher Forschung unterstützt; wir möchten den zuständigen Behörden auch hier unseren Dank wiederholen.

Enniatine A und B dar, die im vorliegenden Mischungsverhältnis eine wesentlich stärkere Giftigkeit für Pflanzen besitzen als die beiden einzelnen Komponenten, eine Tatsache, die für den Biologen von Interesse ist.

Daher prüften wir ein uns von J. GUÉRILLOT-VINET zu Vergleichszwecken überlassenes Baccatin A-Präparat, sowie die Enniatine A und B einzeln und in verschiedenen Mischungsverhältnissen in folgenden biologischen Tests:

a) Welketest

Schädigungen an Tomatensprossen

(Mittel aus vier Parallelversuchen)

Im Gewächshaus gezogene Tomaten der Sorte Tuckswood werden im Vier-Blatt-Stadium geschnitten, gewogen und in Lösungen verschiedenen Toxingehaltes (5 % Aceton; pH 5,5) gestellt (je fünf Pflanzen je Konzentration; Philips Fluoreszenslampen TL 25 W-33 in 60 cm Abstand; 60 bis 70 % rel. Feuchtigkeit; 21 bis 22 °C). Nach Aufnahme von 0,25 ml Toxinlösung je Gramm Tomatenfrischgewicht werden die Sprosse in Brunnenwasser gestellt und die Schädigungen nach 24 Stunden in fünf qualitativen Stufen (0 bis 4) bonitiert. Aus den Mittelwerten wird diejenige Konzentration bestimmt, die eine Schädigung von 1,5 auslöst und also eine Welkeeinheit E_W besitzt. Die Wassermenge in ml, in welcher 1 mg Toxin gelöst werden muß, um eine Schädigungsintensität an Tomatensprossen der Stufe 1,5 auszulösen, entspricht somit der Anzahl Einheiten E_W. Die Dosis minima, die in Milligramm Toxin je Kilogramm Tomatenfrischgewicht ausgedrückt wird, läßt sich aus der Einheit E_W/mg Toxin leicht berechnen:

$$\text{Dosis minima} = \frac{250}{E_W}$$

z. B. für Lycomarasmin: Dosis minima 150 mg/mg; 1,7 E_W/mg,
für Enniatin A: Dosis minima 36 mg/mg; 7 E_W/mg,
für Enniatin B: Dosis minima 21 mg/mg; 12 E_W/mg,
für Baccatin A: Dosis minima 6,8 mg/mg; 37 E_W/mg.

b) Algentest

Wachstumshemmung bei *Chlamydomonas eugametos* Moewus

(Mittel aus vier Parallelversuchen)

Ein Stamm von *Chlamydomonas eugametos* Moewus, den uns Herr Prof. PRINGSHEIM (Göttingen) zur Verfügung stellte, wird in folgender Nährlösung angezogen (nach BURLEW 1953, Seite 249 und 255, modifiziert):

$MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$	2,5 g
KH_2PO_4	1,25 g
Harnstoff	1,05 g
Spurenelementlösung	10 ml
Aqua dest. auf	1000 ml
(pH auf 5,4)	

Spurenelementlösung

$CaCl_2$	8,35 g
$MnCl_2 \cdot 4\ H_2O$	1,44 g
H_3BO_3	11,42 g
$FeSO_4 \cdot 7\ H_2O$	4,98 g
$ZnSO_4 \cdot 7\ H_2O$	8,82 g
H_2MoO_4	0,71 g
$CuSO_4 \cdot 5\ H_2O$	1,57 g
$Co(NO_3)_2 \cdot 6\ H_2O$	0,49 g
Komplexon III	3,0 g

in verd. H_2SO_4 gelöst, auf 1000 ml mit Aqua dest. aufgefüllt.

Je 2 ml der Nährlösung werden in Reagenzgläsern bei 1 atü 20 Minuten sterilisiert. Mit je 2 ml der Testlösung (5 % Aceton; pH 5,5) wird eine Verdünnungsreihe über acht Stufen hergestellt (Konzentration der Toxine 250 bis 2 γ/ml). Das Impfmaterial, auf gleicher Nährlösung in 50-ml-Erlenmeyerkolben 14 Tage bei 21 °C angezogen, wird auf 100 000 Zellen/mm³ verdünnt, und die Reagenzgläser werden mit je einem Tropfen der Suspension beimpft. Nach sechstägiger Inkubation bei 21 °C unter Philips Fluoreszenzlampen TL w/29 im Abstand von 40 cm wird diejenige Verdünnungsstufe abgelesen, bei welcher das Wachstum der Alge halb so stark ist wie in den Kontrollen (= DL_{50} in γ/ml).

c) Plattendiffusionstest

Wachstumshemmung bei *Micrococcus pyogenes* var. *aureus* und *Candida vulgaris*

(Mittel aus zehn Parallelversuchen)

Die Substanzen werden in Konzentrationen von 8 bis 0,06 mg/ml Aceton auf Filterpapierscheibchen aufgetragen und diese auf Nähragarplatten aufgelegt, die zuvor mit *Micrococcus pyogenes* var. *aureus* bzw. *Candida vulgaris* besät worden waren. Nach 14stündiger Inkubation bei 37 °C wird die Grenzkonzentration ermittelt, die noch sichtbare Hemmwirkung aufweist.

d) Einfluss auf den Wasserhaushalt abgeschnittener Tomatensprosse

Die Methode wurde von Gäumann und Jaag (1947) und Gäumann, Kern, Schüepp und Obrist (1958) beschrieben.

Die Resultate ergeben folgendes Bild (Tab. 1):

Tabelle 1

Die antibiotische und phytotoxische Wirksamkeit der Enniatine A und B und ihrer Mischungen im Vergleich zu Baccatin A

Mischungsverhältnis		Hemmungsgrenze im Plattentest mg/ml		Tomatenwelketest E_w/mg	LD_{50} im Algenwachstumstest γ/ml
Enniatin A %	Enniatin B %	*M. pyogenes*	*C. albicans*		
100	0	0,5	0,25	7	30
87,5	12,5	0,5	0,25	14	30
75	25	0,5	0,25	23	30
62,5	37,5	0,5	0,25	23	22
50	50	0,5	0,25	29	19
37,5	62,5	0,5	0,25	34	15
25	75	1	1	26	22
12,5	87,5	2	1	12	26
0	100	4	2	12	45
Baccatin A (Guerillot)		0,5	0,25	36	15
Baccatin A (Hall)		0,5	0,25	38	15

Für *Micrococcus pyogenes* var. *aureus* wie für *Candida vulgaris* ist Enniatin A ungefähr achtmal toxischer als Enniatin B. Im Gemisch zeigt sich mit sinkendem Enniatin A- und mit steigendem Enniatin B-Gehalt, wie erwartet, ein Abfallen der Aktivität. Die Vergleichspräparate von Baccatin A verhalten sich wie das Gemisch B : A = 62,5 : 37,5.

Für Tomatensprosse besitzt Enniatin A eine Giftigkeit von 7 Einheiten je mg, währenddem Enniatin B ungefähr die doppelte Toxizität aufweist (12 E_w/mg). Das Gemisch beider Stoffe zeigt jedoch nicht eine stetige Erhöhung der Giftigkeit mit prozentualer Erhöhung des wirksameren Enniatin B, sondern die beiden Toxine verstärken sich gegenseitig in ihrer Wirkung, wobei das dem Baccatin A zustehende Mischungsverhältnis von B : A = 62,5 : 37,5 eine ungefähr dreimal höhere Wirksamkeit besitzt, nämlich 34 E_w/mg (Baccatin A 36 E_w/mg), als das Enniatin B.

Im gleichen Sinne verschiebt sich die Symptomausprägung:

Bei Enniatin A kollabiert der Stengel unter Rillenblidung von der Schnittfläche her bis höchstens zur Stengelmitte; Blattstiele und -flächen bleiben auch bei hohen Dosen unversehrt. Der Stoff wird, wahrscheinlich infolge seiner geringen Wasserlöslichkeit, nicht weit transportiert.

Bei Enniatin B treten die gleichen Symptome auf wie bei A; die Wirkung geht im Stengel etwas höher; doch bleiben Blattflächen und -stiele intakt. Auch Enniatin B, obwohl etwas besser löslich in Wasser, wird nicht bis in die Blattspreiten der Tomatensprosse verteilt.

Beim Gemisch B : A = 62,5 : 37,5 = Baccatin A kollabieren die Stengel-, Blatt- und Fiederblattstiele unter Rillenbildung und werden fadendünn. Auch der Blattgrund und die Nerven der Fiederblätter werden abgetötet; die ganze übrige Blattfläche erschlafft.

Auch in der Hemmwirkung auf das Algenwachstum verstärken sich die beiden Stoffe. Enniatin A ist für *Chlamydomonas eugametos* giftiger als Enniatin B; die LD 50 liegt bei 30 γ/ml für A, bei 45 γ/ml für B. Mit zunehmendem B-Anteil in der Mischung sinkt die LD 50 bis auf höchstens die Hälfte (15 γ/ml), um nachher wieder gegen den Wert für B anzusteigen. Auch hier ist also im günstigsten Mischungsverhältnis eine deutlich erhöhte toxische Wirkung zu erkennen, die mit derjenigen der Vergleichspräparate identisch ist.

Der Einfluß der Enniatine A und B auf den Wasserhaushalt abgeschnittener Tomatensprosse ist in den Abbildungen 1 und 2 an je einem Beispiel dargestellt.

Die durch Enniatin A ausgelösten Störungen des Wasserhaushaltes folgen im wesentlichen dem Lycomarasmin-Kupfer-Typus von GÄUMANN, KERN und OBRIST (1959): auf eine Drosselung des Wasserumsatzes in den ersten Versuchsstunden folgt eine Lähmungsphase, in der der Wasserumsatz nur noch langsam zurückgeht. Die Wasserabgabe liegt bis zum Versuchsabbruch nach 40 Stunden fast immer etwas unter der Aufnahme; obschon der Sproß nach 40 Stunden total 318 mg Enniatin A je kg Frischgewicht aufgenommen hat, hat er noch keinen Wasserverlust erlitten. Beim Abbruch des Versuches sind lediglich die unteren Blätter etwas schlaff und gelblich; der Stengel ist noch intakt. Läßt man den Sproß anschließend einige Tage in Wasser stehen, treten an den Blattspreiten nekrotische Flecke und am Stengel Rillen auf.

Die durch das Enniatin B ausgelösten Schädigungen entsprechen im wesentlichen dem Lycomarasmin-Typus (GÄUMANN, KERN und

Obrist 1959): auf eine anfängliche Drosselungsphase (ohne Wasserverlust, wie beim Lycomarasmin-Kupfer-Typus) folgt eine Phase der übersteigerten Wasserabgabe mit einem vorübergehenden Wiederanstieg der Wasserabgabe. Zu Beginn des Wasserverlustes (nach 22 Stunden) hat der Sproß total 183 mg

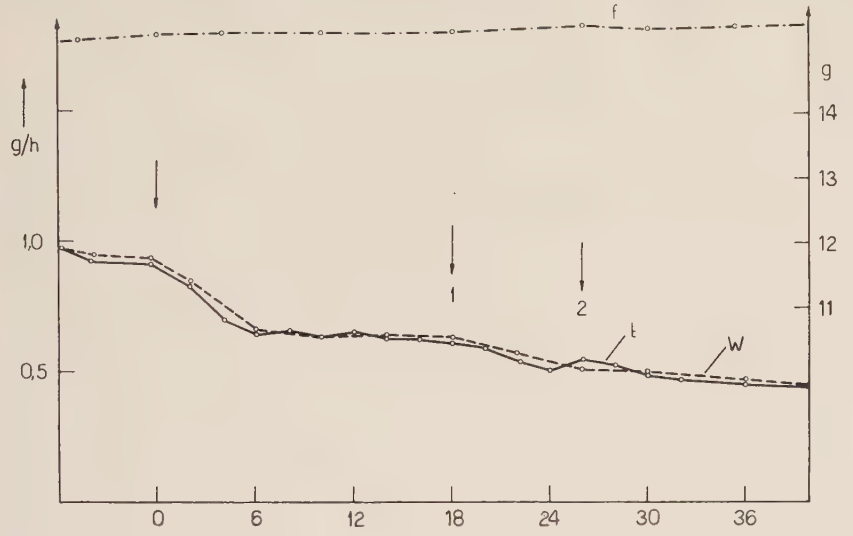

Abb. 1. Der Einfluß einer $5 \cdot 10^{-4}$ molaren Lösung von Enniatin A in 5 % Äthanol auf den Wasserhaushalt eines abgeschnittenen Tomatensprosses im Licht. Abszisse: Stunden nach Beginn der Giftzugabe (durch einen Pfeil angedeutet). Ordinaten: w = Flüssigkeitsaufnahme, t = Transpiration des gesamten Sprosses, beide in Gramm je Stunde; f = Frischgewicht des Sprosses in Gramm; 1 unterstes Blatt etwas schlaff; 2 untere drei Blätter gelblich, etwas schlaff

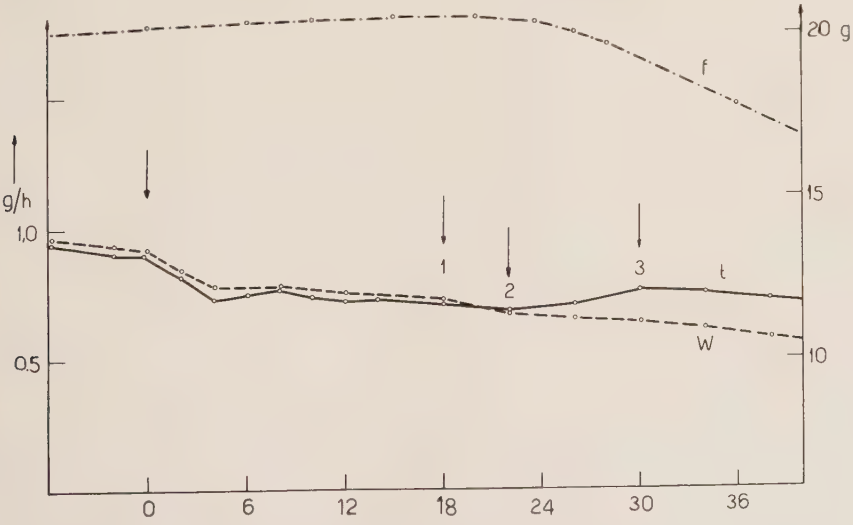

Abb. 2. Der Einfluß einer $5 \cdot 10^{-4}$ molaren Lösung von Enniatin B in 5 % Äthanol auf den Wasserhaushalt eines abgeschnittenen Tomatensprosses. Abszisse und Ordinaten wie in Abbildung 1. 1 untere Blätter schlaff; 2 erste Furchen im Stengel; 3 alle Blätter schlaff

Enniatin B je kg Frischgewicht aufgenommen. Nach 40 Stunden beträgt der Wasserverlust rund 17 %; in diesem Zeitpunkt sind alle Blätter schlaff, der Stengel ist im unteren Teil gefurcht und die Blattstiele hängen schlaff herunter. Läßt man den Sproß anschließend noch einige Tage im Wasser stehen, werden die gesamten Blattspreiten dürr und nekrotisch, und der Stengel erschlafft mehr und mehr.

Der Einfluß des Baccatin A auf den Wasserhaushalt von Tomatensprossen wurde von GÄUMANN, KERN und OBRIST (1959) beschrieben. Er entspricht in Kurvenverlauf und Symptomausprägung demjenigen des Enniatin B; auf eine anfängliche Drosselung folgt eine Phase der übersteigerten Wasserabgabe. Nach den bisherigen Versuchen, die nur mit relativ wenigen Pflanzen durchgeführt werden konnten, wirkt Baccatin A stärker als Enniatin B; in Abbildung 3 bei GÄUMANN, KERN und OBRIST (1959) beginnt der Wasserverlust bereits bei einer Aufnahme von 114 mg Baccatin A je kg Frischgewicht (gegenüber 183 mg beim Enniatin B in Abbildung 2 der vorliegenden Arbeit), und die Symptome an Stengeln und Blättern sind am Versuchsende deutlich stärker ausgeprägt.

Aus diesen Versuchen geht hervor, daß die Enniatine A und B in einem optimalen Mischungsverhältnis, das demjenigen von Baccatin A entspricht, für Pflanzen eine zwei- bis dreimal höhere Toxizität besitzen als die beiden Komponenten für sich allein. Die zwei Stoffe verstärken sich in ihrer phytotoxischen Wirkung im Sinne eines Synergismus: die für Baccatin A festgestellte Kombination von Enniatin A und B zeigt eine deutlich stärkere Hemmwirkung auf das Wachstum von *Chlamydomonas eugametos;* an Tomatenpflanzen löst sie andersartige Symptome in geringeren Konzentrationen aus, erzwingt eine ausgeprägtere Drosselung des Wasserumsatzes, und die anschließende Übersteigerung der Wasserabgabe führt bei geringerer Giftdosis zu einem stärkeren Gewichtsverlust der vergifteten Pflanzen. Also dürfte dem prozentualen Anteil der Bildung von Enniatin A und B in der vom Pilz befallenen Pflanze eine wesentliche Bedeutung für den Krankheitsverlauf zukommen. Allerdings scheint dieser Synergismus in der Wirkung der Toxine auf Bakterien und Pilze im Plattentest und auf die Wasserpermeabilität von *Rhoeo*-Protoplasten (GÄUMANN und OBRIST 1959) nicht zum Ausdruck zu kommen. Worauf er im einzelnen beruht, muß durch weitere Experimente über Angriffspunkt und Art der Wirkung erst geklärt werden.

Summary

Baccatin A, a metabolic product of *Gibberella baccata* (Wallr.) Sacc. is shown to consist of a mixture of the Enniatins A and B, which proved difficult to separate. The phytotoxic activity of the combined Enniatins increases synergistically: against tomatoes and algae the toxicity of a mixture of Enniatin A and B (37.5 : 62.5) is two to three times greater than the toxicity of either Enniatin applied singly.

Literaturverzeichnis

Burlew, J. S., 1953: Algal culture. Carnegie Inst. Washington, 600, 357 S.

Gäumann, E., 1957: Über Fusarinsäure als Welketoxin. Phytopath. Z. **29**, 1—44.

— —, L. Ettlinger und St. Naef-Roth, 1950: Zur Gewinnung von Enniatinen aus dem Myzel verschiedener Fusarien. l. c. **16**, 289—299.

— —, H. Kern, H. Schüepp und W. Obrist, 1958: Der Einfluß der Fusarinsäure auf den Wasserhaushalt abgeschnittener Tomtaensprosse. l. c. **32**, 225—244.

— —, — — und W. Obrist, 1959: Der Einfluß einiger Welketoxine auf den Wasserhaushalt abgeschnittener Tomatensprosse. l. c. **36**, 111—121.

— —, und O. Jaag, 1947: Die physiologischen Grundlagen des parasitogenen Welkens I—III. Ber. Schweiz. Bot. Ges. **57**, 3—34, 132—148, 227—241.

— —, und St. Naef-Roth, 1959: Über Lycomarasminsäure, ein Umwandlungsprodukt des Lycomarasmins. Phytopath. Z. **34**, 426—431.

— —, und W. Obrist, 1959: Über die Schädigung der Wasserpermeabilität pflanzlicher Protoplasten durch einige Welketoxine. l. c. **37**, 145—158.

Guérillot-Vinet, M., et Mme. J., L. Guyot, J. Montégut et L. Roux, 1950: Sur une substance antibiotique extraite du mycelium de *Gibberella baccata* (Wallr.) Sacc. Compt. r. Acad. Sci. Paris, **230**, 1424—1426.

Hall, G., 1960: The identity of Baccatin A as a mixture of Enniatin A and B. Chemistry and Industry **41**, 1270.

Kugler, Fr., 1959: Über welkeaktive Inhaltsstoffe von *Endothia parasitica* (Murr.) And. und *Fusarium solani* (Mart.) v. Martii. Diss. ETH Nr. 2816, 63 S.

Nager, U., 1948: Über die Chemie der Enniatine. Diss. ETH (Basel, Birkhäuser), 42 S.

Aus der Biologischen Zentralanstalt der Deutschen Akademie der Landwirtschaftswissenschaften zu Berlin, Institut für Phytopathologie Aschersleben, und der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Institut für Virusserologie, Braunschweig

Interferenzen zwischen den Viren der Tabakätzmosaik-Gruppe

Von

K. Schmelzer, R. Bartels und M. Klinkowski

Mit 10 Abbildungen

Inhalt: I. Einleitung. — II. Material und Methoden. — III. Experimentelle Untersuchungen. A. Erstinfektionen mit dem Tabakätzmosaik-Virus (severe etch strain); 1. Zweitinfektionen mit Stämmen des Kartoffel-Y-Virus, 2. Zweitinfektionen mit dem Bilsenkrautmosaik-Virus, 3. Zweitinfektionen mit Stämmen des Kartoffel-A-Virus; B. Erstinfektionen mit dem Bilsenkrautmosaik-Virus; C. Erstinfektionen mit Stämmen des Kartoffel-Y-Virus; D. Mischinfektionen. — IV. Diskussion der Versuchsergebnisse. — Zusammenfassung. — Summary. — Literaturverzeichnis.

I. EINLEITUNG

Die Erscheinung, daß eine Pflanze durch die Besiedlung mit einem Virusstamm gegen Infektionen mit weiteren Stämmen der gleichen Virusart mehr oder weniger geschützt ist, wird seit ungefähr einem Vierteljahrhundert als Test für die Verwandtschaft von Viren angewandt. Vielfältige Erfahrungen haben gelehrt, daß diese mit „Prämunität" bezeichnete Abwehrreaktion nur bei eng zusammengehörigen Virusstämmen auftritt und bereits bei serologisch nahe verwandten Viren versagen kann. Beispiele dafür sind die Tabakrippenbräune-Stämme des Kartoffel-Y-Virus, die sich im allgemeinen nicht durch normale Stämme abwehren lassen, sowie das Tomatenaspermie-Virus, bei dem Prämunitätsversuche mit dem eng verwandten Gurkenmosaik-Virus unterschiedliche Ergebnisse geliefert haben.

Daher ist die Tatsache besonders interessant, daß gelegentlich auch Abwehr bzw. Unterdrückung zwischen nicht nahe verwandten Viren beobachtet worden ist. Die ersten Fälle dieser Art wurden durch Bawden und Kassanis (1941, 1945) beschrieben. Wenn sie Gemische des starken Stammes des Tabak-

ätzmosaik-Virus (tobacco severe etch virus) mit dem normalen Kartoffel-Y-Virus bzw. dem Bilsenkrautmosaik-Virus auf Tabakpflanzen verimpften, so fanden sie nach einiger Zeit in den jüngeren nachgewachsenen Blättern nur das Tabakätzmosaik-Virus, nicht aber die andere Komponente des jeweiligen Virusgemisches. Bei einer Mischinfektion des Kartoffel-Y- mit dem Bilsenkrautmosaik-Virus war nur das letztgenannte Virus im Zuwachs von Tabakpflanzen serologisch nachweisbar.

Zwei Tatsachen seien angeführt, die uns zur Nachprüfung der Interferenzerscheinungen zwischen Tabakätzmosaik- und Kartoffel-Y-Virus veranlaßten. 1. Klinkowski und Schmelzer (1957) stellten fest, daß eine Erstinfektion mit dem starken Stamm des Tabakätzmosaik-Virus (*Marmor erodens* Holmes) nicht vor Befall durch den Tabakrippenbräune-Stamm „M 3" des Kartoffel-Y-Virus (*M. upsilon* Holmes) schützt. 2. Der Tabakzuchtstamm „V 20" war für einige normale Stämme des Kartoffel-Y-Virus anfällig und wies deutliche Symptome auf, während das Tabakätzmosaik-Virus ihn nicht systemisch infizierte (Schmelzer und Klinkowski 1959). Damit war eine Filterpflanze für die Abtrennung des Kartoffel-Y-Virus aus Gemischen mit dem Tabakätzmosaik-Virus gefunden.

Späterhin erwies es sich als wünschenswert, auch die Interferenz zwischen dem Bilsenkrautmosaik-Virus (*Marmor hyoscyami* Holmes) und den beiden vorgenannten Viren neu zu untersuchen. Dadurch waren alle Viren, die nach Holmes (1948) zur Tabakätzmosaik-Gruppe gehören, in die Experimente einbezogen. Zusätzlich wurde auch das Kartoffel-A-Virus (*Marmor solani* Holmes) berücksichtigt. Dieses Virus stimmt in verschiedenen Eigenschaften mit dem Y-Virus überein. Somit erscheint die Einordnung des A-Virus in die Tabakätzmosaik-Gruppe berechtigt (Schmelzer und Klinkowski 1959). Außerdem griffen wir die bereits in zahlreichen Arbeiten behandelte Frage nach den Prämunitätserscheinungen zwischen verschiedenen Stämmen des Kartoffel-Y-Virus nochmals auf und haben mit Hilfe von Differentialwirtspflanzen und der serologischen Methode die Konzentrationsverhältnisse der Viren in den Interferenzversuchen ermittelt.

II. MATERIAL UND METHODEN

Die zu den Versuchen verwendeten Viren wurden bereits in früheren Arbeiten beschrieben. Die Reaktion eines Teiles von ihnen auf verschiedenen Differentialwirten ist kürzlich mitgeteilt worden (Schmelzer und Klinkowski 1959). Die im Zusammenhang mit der vorliegenden Arbeit wichtigen Differentialmerkmale sind in Tabelle 1 zusammengestellt. Am Tabak erfolgte die Erstinfektion im Zwei- bis Vierblattstadium durch Einreibungen an zwei Blättern, die Zweitinfektion in der Regel 12 bis 28 Tage nach der Erstinfektion, zuweilen noch später. Wenn diesbezügliche Angaben fehlen, wurden die Beimpfungen mit unverdünntem Preßsaft unter Verwendung von Karborund vorgenommen. Die Zweitinfektion erfolgte beim Tabak stets an einem bis zwei jüngeren, deutliche Symptome einer systemischen Erkrankung zeigenden Blättern und bei *Physalis floridana* an mehreren Blättern, weil hier Lokalläsionen zu erwarten waren. Abänderungen der Methodik sind im Text besonders vermerkt. Zur Kontrolle wurden Pflanzen eingeschaltet, bei denen an Stelle der Erst- bzw. Zweitinfektion eine Einreibung mit Preßsaft virusfreier Pflanzen vorgenommen worden war.

Wenn sich der Erfolg der Zweitinfektion nicht durch eindeutige Symptome nachweisen ließ, wurden zusätzlich andere Testpflanzen eingerieben oder serologische Nachweismethoden benutzt. Die gleichen Hilfsmittel wurden auch zur quantitativen Feststellung des Virusgehaltes herangezogen. Soweit nicht anders angegeben, wurden nicht die mit dem zweiten Virus eingeriebenen, sondern Folgeblätter getestet. In der Regel wurden für die Untersuchungen mittels Testpflanzen Sammelpreßsäfte aus mehreren Blättern verschiedener gleichartig behandelter Pflanzen hergestellt. Die Testung erfolgte nicht vor der vierten Woche nach der Zweitinfektion. Verdünnungen wurden mit destilliertem Wasser angesetzt.

Für die serologischen Untersuchungen mit dem Präzipitintest wurden zunächst Antiseren gegen Y- und Tabakätzmosaik-Virus nach einer früher beschriebenen Methodik (BARTELS 1957) hergestellt; beide Seren konnten ohne Absättigung mit den heterologen Antigenen zum Nachweis der Viren nebeneinander gebraucht werden, da sich in Vorversuchen herausgestellt hatte, daß sie bei entsprechender Verdünnung nur homologe Reaktionen ergaben. Die Konzentrationsbestimmungen erfolgten durch Ermittlung des Antigentiters mit Hilfe von Verdünnungsreihen der Blattpreßsäfte, wobei sämtliche Blätter der mischinfizierten Pflanzen 8 bis 9 und 12 Wochen p. i. geprüft wurden.

Die Untersuchungen liefen mit einigen zeitlichen Unterbrechungen von Sommer 1956 bis Frühjahr 1959.

III. EXPERIMENTELLE UNTERSUCHUNGEN

In der weiteren Darstellung werden Tabakätzmosaik- und Bilsenkrautmosaik-Virus durch entsprechende Abkürzungen („TÄV" bzw. „BMV") ersetzt und bei den Stämmen des Kartoffel-Y- und -A-Virus häufig nur die Bezeichnung des jeweiligen Stammes gebraucht (vgl. Tab. 1).

Die Bezeichnung „TÄV/M 1" gibt an, daß Pflanzen mit dem Tabakätzmosaik-Virus erstinfiziert und mit dem Stamm „M 1" des Kartoffel-Y-Virus zweitinfiziert wurden; „TÄV/K" drückt aus, daß bei der zweiten Einreibung zur Kontrolle Material einer gesunden Pflanze verimpft wurde. Sinngemäß wurde bei den übrigen Viren bzw. Stämmen verfahren.

A. Erstinfektionen mit dem Tabakätzmosaik-Virus (severe etch strain)

1. Zweitinfektionen mit Stämmen des Kartoffel-Y-Virus

Wie eingangs erwähnt, schützten Erstinfektionen mit TÄV nicht vor Zweitinfektionen mit dem Stamm „M 3" der Tabakrippenbräune. Auch wenn statt „M 3" der Stamm „Wi" der Rippenbräune verwendet wurde, traten deutliche Nekrosen der Blattadern an den Samsunpflanzen auf, und zwar unabhängig davon, ob diese mit TÄV erstinfiziert worden waren oder nicht. Selbst bei einer Preßsaftverdünnung von 10^{-3} war der Stamm „Wi" neben dem TÄV in Pflanzen nachzuweisen, die am 28. September 1956 erst-, am 18. Oktober zweitinfiziert und am 19. November getestet wurden. Ein ähnliches Ergebnis brachte die Einreibung verdünnten Preßsaftes aus Pflanzen, bei denen „M 3" zur Zweitinfektion angesetzt worden war. In dieser Versuchsreihe wurde festgestellt, daß die Erstinfektion durch TÄV die Konzentration von „M 3" nicht auf die übliche Höhe anwachsen ließ. Fünf von sechs Samsunpflanzen, die mit Preßsaft in einer Verdünnung von 10^{-2} beimpft worden waren, zeigten „M 3"-Symptome, während sich dieser Virusstamm in Reinkultur bei gleicher Verdünnung als hundertprozentig infektiös erwies (KLINKOWSKI und SCHMELZER 1957). In der Verdünnungsstufe 10^{-3} er-

Virus	Stamm	*Nicotiana tabacum* L. Sorte „Samsun“	*Nicotiana tabacum* L. Zuchtstamm „V 20“	*Physalis floridana* Rydb.	*Physalis peruviana* L.	*Solanum demissum*-Bastard „A 6“	*Petunia hybrida* hort. ex. Vilm.
Tabakätzmosaik	starker Stamm	Mosaik und Ätzmuster, Stauchung	keine systemische Anfälligkeit	Mosaik	nekrotische Lokalläsionen	systemische Infektion, keine Lokalläsionen	
Bilsenkrautmosaik		starkes Mosaik und Stauchung, meist schnelles Absterben der Pflanzen	chlorotische bis nekrotische Lokalläsionen, starkes Mosaik	Mosaik	keine Lokalläsionen		
Kartoffel-Y	DJ[1], DJ[2], GA, Go 16	Perlmuster				ringförmige Lokalläsionen	
	TEB, M 1	Perlmuster	Perlmuster		keine Lokalläsionen		
	YI, YIII, NY 2	Perlmuster		nekrotische Lokalläsionen und systemische Symptome			
	Y S	Mosaik und nekrotische Blattflecke		Mosaik			
	M 3	Rippenbräune	keine systemische Anfälligkeit				Lokalläsionen und systemische Symptome
	Wi	Rippenbräune	Rippenbräune	Mosaik			keine Lokalläsionen, systemische Symptome
	LüA	Rippenbräune		Mosaik			
Kartoffel-A	P 716/12	Perlmuster		keine Lokalläsionen		fleckenförmige Lokalläsionen	
	Sabina g, Magna 556	Perlmuster		nekrotische Lokalläsionen		fleckenförmige Lokalläsionen	

krankten sogar nur zwei von sechs Pflanzen. Dieses Ergebnis liegt ebenfalls unter den Werten, die bei entsprechenden Preßsäften ohne TÄV-Komponente erzielt werden konnten. Beim TÄV selbst war keine konzentrationsverringernde Wirkung der Zweitinfektion mit „M 3" zu ermitteln. Der Preßsaft mischinfizierter Pflanzen verursachte noch bei der Verdünnung 10^{-3} die Erkrankung aller beimpften Pflanzen.

Nach dem Beweis, daß eine Erstinfektion mit TÄV den Tabak nicht vor einer Zweitinfektion mit Tabakrippenbräune-Stämmen schützt, wurden Versuche zur Abwehr von normalen Stämmen des Kartoffel-Y-Virus unternommen. Die Tatsache, daß die Stämme „M 1" und „TEB" den Tabakzuchtstamm „V 20" befallen können, während das „TÄV" im allgemeinen dazu nicht in der Lage ist, ergab eine Möglichkeit zum Nachweis dieser Stämme neben dem TÄV. Zum anderen konnte die Konzentration des TÄV mit Hilfe von *Physalis peruviana* bestimmt werden. Diese Pflanze reagierte auf den starken Stamm (severe strain) des genannten Virus durch deutliche nekrotische Lokalläsionen (HOLMES 1942; siehe auch Abb. 1), während die von uns geprüften Y-Virusstämme sowie das BMV auf ihr keine Nekrosen verursachten. Für eine andere Form der Differentialdiagnose benutzten wir *Physalis floridana*, auf der die Normalstämme „Y III" und „NY 2" nekrotische Lokalläsionen und systemische Nekrosen hervorriefen (vgl. Abb. 2), das TÄV dagegen nur ein starkes Mosaik, Blattdeformationen und Stauchung bewirkte.

Abb. 1. *Physalis peruviana*-Blätter zwölf Tage nach der Abreibung mit dem starken Stamm des Tabakätzmosaik-Virus. Nekrotische Läsionen auf normal grünem Blatt (links) mit gelblichem Hof, auf vergilbendem Blatt (rechts) mit grünem Hof (Durchlichtaufnahme)

Die Erkrankung des Samsuntabaks nach Zweitinfektionen mit Tabakrippenbräune-Stämmen war verzögert, aber deutlich neben dem TÄV kenntlich. Im Gegensatz dazu konnte das normale Kartoffel-Y-Virus niemals an TÄV-infiziertem Samsun beobachtet werden. Die Ergebnisse in Tabelle 2

lassen jedoch erkennen, daß sich der Stamm „M 1" des Kartoffel-Y-Virus auch in bereits vom TÄV besiedelten Pflanzen durchzusetzen vermag. Die gleichen Befunde wurden mit „TEB" erzielt. Schon einen Monat nach der Zweitinfektion gewonnener Preßsaft (Verdünnung 10^{-2}) aus einer TÄV/TEB-Pflanze ließ alle beimpften „V 20" durch „TEB" erkranken. Ein weiterer Versuch mit „M 1" zeigte, daß sowohl die „M 1"- als auch die TÄV-Aktivität in mischinfizierten Pflanzen im Vergleich zu entsprechenden Kontrollen vermindert sein können[1]).

In Versuchen, bei denen *Physalis floridana* mit TÄV eingerieben worden war und eine Beimpfung mit „Y III" bzw. „NY 2" wesentlich später folgte, konnten die nekrotischen

Abb. 2. *Physalis floridana* mit Lokalläsionen des Kartoffel-Y-Virusstammes „Y III". Links: K/Y III, Mitte: BMV/Y III, rechts: TÄV/Y III. Erstinfektion mit TÄV: 17. Dezember 1958, Erstinfektion mit BMV: 6. Januar 1959, Zweitinfektion mit Y III: 14. Februar 1959, photographiert: 2. März 1959

Tabelle 2

Konzentration des Tabakätzmosaik- und des Kartoffel-Y-Virus nach zeitlich abgestufter Infektion

Versuchspflanze: Tabak, Sorte „Samsun", Prüfungstermin: 25. Januar 1957
Erstinfektion mit TÄV: 14. August 1956, Zweitinfektion mit „M 1": 27. August 1956

Infektion	Testpflanze	Preßsaftverdünnung unverdünnt	10^{-1}	10^{-2}
Testung auf „M 1"				
TÄV/K	„V 20"	0/2*)	—	0/4
TÄV/M 1	„V 20"	—	4/4	3/4
K/M 1	„V 20"	—	4/4	4/4
Testung auf TÄV				
TÄV/K	*Physalis peruviana*	15,9**)	7,4	—
TÄV/M 1	*Physalis peruviana*	15,3	1,8	—
K/M 1	*Physalis peruviana*	0	—	—

*) Der Zähler gibt die Anzahl der infizierten, der Nenner die der beimpften Pflanzen an.

**) Durchschnittliche Anzahl der Lokalläsionen auf jeweils zehn Blatthälften.

[1]) Infektionsergebnisse geben streng genommen Virusaktivitäten an. Wir sprechen hier meist nur von Konzentrationen, da die ermittelten Aktivitätsverminderungen zweifellos Konzentrationsverminderungen widerspiegeln.

Lokalläsionen dieser Y-Virus-Stämme nach 16 Tagen an den mischinfizierten sowie an Kontrollpflanzen festgestellt werden (Abb. 2). Da das TÄV die Blätter der erstgenannten wesentlich verkleinerte, war es unmöglich, an Hand der Lokalläsionen exakte Aussagen darüber zu machen, wie weit das TÄV die Y-Infektion behinderte. Eine Verringerung der Läsionszahlen hat das TÄV jedoch verursacht. Abbildung 3 läßt erkennen, daß auch die Folgeblätter TÄV-erstinfizierter *Physalis floridana* vom normalen Kartoffel-Y-Virus besiedelt werden. Die K/„NY 2"-Pflanzen gingen eher als die TÄV/„NY 2"-Pflanzen durch Nekrosen ein. Das gleiche Ergebnis war bei einer Zweitinfektion mit „Y III" zu beobachten.

Abb. 3. *Physalis floridana*, von links nach rechts: TÄV/K, TÄV/NY 2, K/NY 2 und K/K. Erstinfektion: 10. November 1958, Zweitinfektion: 23. Januar 1959, photographiert: 19. Februar 1959

Serologische Untersuchungen

Eine Reihe von Samsunpflanzen wurde mit TÄV erstinfiziert und $2^1/_2$ Wochen später in Gruppen zu jeweils vier bis sechs Exemplaren mit fünf verschiedenen Y-Normalstämmen zweitinfiziert. Nach weiteren $4^1/_2$ Wochen wurden Preßsäfte aus Blatthälften einzelner neugebildeter Blätter der doppelt infizierten Pflanzen, einschließlich entsprechender Kontrollen, mit TÄV- und Y-Antiserum geprüft. Das Ergebnis ist in Tabelle 3 zusammengefaßt und läßt erkennen, daß die fünf normalen Y-Virusstämme in TÄV-infiziertem Gewebe Fuß zu fassen vermochten. Nicht alle Pflanzen einer Infektionsgruppe reagierten mit dem Y-Antiserum positiv, so daß ein unterschiedliches Durchdringungsvermögen der Y-Virusstämme vorliegen konnte; die Klärung dieser Frage erfolgte durch Untersuchung der Konzentrationsverhältnisse an den mischinfizierten Pflanzen.

Das Ergebnis der quantitativen Prüfungen 8 bis 9 Wochen p. i. ist aus Tabelle 4 zu entnehmen, in der charakteristische Einzelwerte aus mehreren Versuchsreihen aufgeführt worden sind. Ein Vergleich des mischinfizierten Tabaks mit den Reinkulturen läßt eine Konzentrationsminderung des Y-Virus deutlich werden, während das TÄV auf der gleichen Höhe wie die Kontrollen blieb. Unterschiede im Durchdringungsvermögen verschiedener Y-Normalstämme ließen sich auf Grund des vorliegenden Zahlenmaterials jedoch nicht feststellen. — Besonders erwähnt sei ein Einzelbefund im mittleren Blattbereich einer TÄV/TEB-Pflanze: In zwei unmittelbar aufeinanderfolgenden

Blättern konnte serologisch keine Mischinfektion nachgewiesen werden; das untere Blatt enthielt nur TÄV, das darüberliegende nur Y-Virus. An diesem Beispiel wird ersichtlich, wie vorsichtig Interferenzversuche zu beurteilen sind, die nur auf der Prüfung einzelner Blätter und nicht auf der Analyse der gesamten mischinfizierten Pflanzen beruhen.

Weitere quantitative Untersuchungen älterer Pflanzen (12 Wochen p. i. und mehr) zeigten in den unteren Blattbereichen vielfach negative oder unspezifische Reaktionen, daneben waren — wie auch bei den jüngeren Pflanzen (Tab. 4) — Blätter mit TÄV oder Y-Virus allein zu finden; bei einem weiteren Teil der Pflanzen konnten jedoch noch beide Viren einwandfrei nebeneinander in demselben Blatt nachgewiesen werden. Wurden Preßsäfte derartiger Proben auf jungem Tabak abgerieben und 8 Wochen p. i. serologisch geprüft, so ließen sich die Viren wiederum nebeneinander nachweisen; eine Unterdrükkung des Y-Virus oder des TÄV konnte demnach nicht beobachtet werden.

Tabelle 3

Serologische Reaktionen mischinfizierter Tabakpflanzen (TÄV/Y)

Infektion	Antiseren	
	TÄV	Y
TÄV/Y DJ 1	6/6*)	2/6
TÄV/Y DJ 2	4/4	3/4
TÄV/Y GA	6/6	2/4**)
TÄV/ Y GO 16	5/5	4/5
TÄV/Y TEB	5/5	5/5
TÄV/K	4/4	0 4
Y DJ 2 K	0/1	1/1
Y GO 16/K	0/1	1/1
Y TEB K	0/1	1/1

*) Zähler = Anzahl der serologisch positiven Reaktionen, Nenner = Anzahl der geprüften Pflanzen.

**) Zwei weitere Pflanzen fraglich.

Tabelle 4

Serologisch ermittelte Viruskonzentration (Titerwerte einzelner Blätter) in TÄV/Y-infizierten Tabakpflanzen 8 bis 9 Wochen p. i.

Blattbereich	TÄV	DJ_1	TÄV	DJ_2	TÄV	GA	TÄV	Go 16	TÄV	TEB	Kontrollen TÄV	Kontrollen DJ
unten	∅	∅	1:4	1:16	∅	1:8	∅	1:32	∅	1:4	∅	1:16
Mitte	1:4	1:32	1:16	∅	1:8	1:16	∅	1:32	1:2 ∅	∅ 1:8	1:4	1:64
oben	1:32	∅	1:32	∅	1:16	1:2	1:8	1:8	1:8	1:8	1:32	1:128

2. Zweitinfektionen mit dem Bilsenkrautmosaik-Virus

Es wurde geprüft, ob der starke Stamm des TÄV die Fähigkeit besitzt, Infektionen mit BMV abzuwehren. Methodisch waren die Versuche wesentlich einfacher als mit dem normalen Kartoffel-Y-Virus. Das BMV erzeugt stärkere und deutlich vom TÄV zu unterscheidende systemische Symptome an Samsuntabak, so daß das Gelingen der Zweitinfektion ohne weiteres erkennbar wird. Zur quantitativen Feststellung der TÄV-Aktivität wurde wiederum *Physalis peruviana* benutzt, während das BMV auf „V 20" oder „Virgin Gold A" nekrotische, gut sichtbare Lokalläsionen verursacht (Abb. 4).

In mehrfachen Wiederholungen wurde erwiesen, daß die K/BMV-Pflanzen heftigere Schäden als die TÄV/BMV-Pflanzen erlitten, in denen sich das BMV gegenüber dem TÄV durchzusetzen vermochte (Abb. 5). Die geringsten Schäden zeigten die TÄV/K-Pflanzen. In Tabelle 5 sind die Ergebnisse eines Versuches dargestellt, bei dem ein Sammelpreßsaft aus mehreren TÄV/BMV-Pflanzen verwendet wurde. In einem anderen Versuch war die Anzahl der TÄV-Läsionen weniger stark herabgesetzt. Wie deutlich die BMV-Konzentration von der Symptomstärke abhängt, geht aus Tabelle 6 hervor.

Abb. 4. Lokalläsionen des Bilsenkrautmosaik-Virus an einem Blatt des Tabakzuchtstammes „V 20" 13 Tage nach der Beimpfung

Tabelle 5

Konzentration des Tabakätzmosaik- und des Bilsenkrautmosaik-Virus nach zeitlich abgestufter Infektion

Versuchspflanze: Tabak, Sorte „Samsun"
Erstinfektion mit TÄV: 14. August 1956
Zweitinfektion mit BMV: 27. August 1956
Prüfungstermin: 10. Oktober 1956

Infektion	Testpflanze	Preßsaftverdünnung			
		unverdünnt	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}
Testung auf BMV					
K/BMV	Virgin Gold A	—	—	771*)	191
TÄV/BMV	Virgin Gold A	—	—	168	65
TÄV/K	Virgin Gold A	0	—	—	—
Testung auf TÄV					
K/BMV	*Physalis peruviana*	0	—	—	—
TÄV/BMV	*Physalis peruviana*	—	40	—	—
TÄV/K	*Physalis peruviana*	—	96	—	—

*) Anzahl der Lokalläsionen, die im Durchschnitt auf 10 Blättern („Virgin Gold A") bzw. 10 Blatthälften (*Physalis peruviana*) entstanden.

Tabelle 6

Konzentration des Bilsenkrautmosaik-Virus in TÄV-erstinfizierten Pflanzen mit unterschiedlicher Symptomstärke

Versuchspflanze: Tabak, Sorte „Samsun"
Erstinfektion mit TÄV: 13. November 1956
Zweitinfektion mit BMV: 1. Dezember 1956
Prüfungstermin: 8. Januar 1957
Testpflanze: „V 20"

Infektion	BMV-Symptome	Preßsaftverdünnung		
		unverdünnt	10^{-2}	10^{-3}
TÄV/BMV	stark	—	1191*)	98
TÄV/BMV	schwach	—	524	53
TÄV/BMV	keine	—	0	0
TÄV/K**)	keine	0	—	—

*) Durchschnittliche Anzahl der Lokalläsionen des BMV auf 10 Blättern.
**) Die K/BMV-Pflanze konnte nicht untersucht werden, da sie auf Grund der Viruseinwirkung zum Zeitpunkt der Testung abgestorben war.

Abb. 5. Samsunpflanzen, links: TÄV/K, Mitte: TÄV/BMV, rechts: K/BMV. Erstinfektion: 19. November 1956, Zweitinfektion: 21. Dezember 1956, photographiert: 21. Januar 1957

3. Zweitinfektionen mit Stämmen des Kartoffel-A-Virus

Versuche zur Interferenz zwischen TÄV- und A-Virus wurden ebenfalls mit mehreren Pflanzenarten durchgeführt. Eine junge virusfreie Pflanze des *Solanum demissum*-Bastards „A 6" wurde am 8. Oktober 1958 mit TÄV eingerieben. Nach einigen Wochen stellte sie, wahrscheinlich auf Grund der ungünstigen Jahreszeit, ihr Wachstum ein. Nach der Infektion waren lediglich zwei symptomfreie Folgeblätter zur Entwicklung gekommen. Von jedem dieser Blätter wurde am 7. November 1958 jeweils ein Stück der Basis und der Spitze abgeschnitten und getrennt auf Samsun und *Physalis peruviana* getestet. In allen vier Blattproben konnte TÄV nachgewiesen werden. Entsprechende Testungen an Kontrollblättern verliefen negativ. Zum gleichen Zeitpunkt wurden die nicht zum Virusnachweis verbrauchten Teile der Blattspreiten mit dem Stamm „P 716/12" des Kartoffel-A-Virus im Schalentest beimpft. Sowohl die mit TÄV erstinfizierten als auch die nicht erstinfizierten Blätter bildeten die für das A-Virus charakteristischen nekrotischen Läsionen aus. Wegen recht unterschiedlicher Blattgrößen wurden die Lokalläsionen jeweils nur auf Flächen von 2,25 cm² ausgezählt. Für K/P 716 ergab sich ein Durchschnitt von 45 Läsionen, bei TÄV/P 716 betrug der entsprechende Wert 26,5.

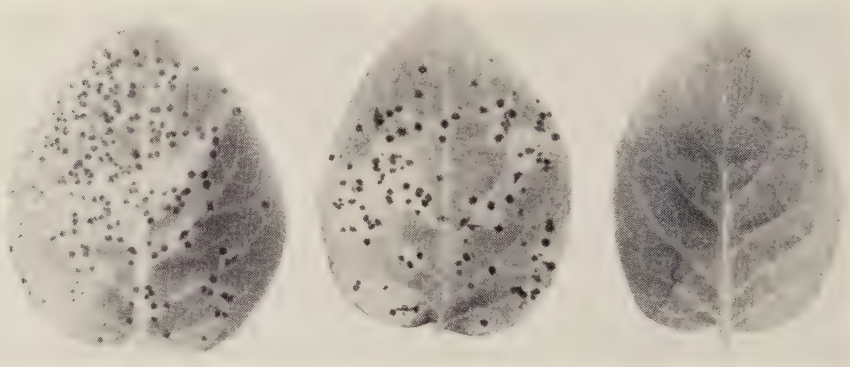

Abb. 6. Blätter des *Solanum demissum*-Bastards „A 6" vier Tage nach der Beimpfung im Schalentest. Links: K/P 716-Preßsaft (236 Läsionen), Mitte: TÄV/P 716-Preßsaft (112 Läsionen), rechts: TÄV-Preßsaft (keine Läsionen)

Da die TÄV-beimpfte „A 6" keine Symptome ausgebildet und frühzeitig ihr Wachstum eingestellt hatte, konnte trotz der positiv verlaufenen Rückteste auf TÄV nicht völlig ausgeschlossen werden, daß lediglich eine mangelhafte Besiedlung durch dieses Virus dem Kartoffel-A-Virusstamm das Eindringen in das „A 6"-Gewebe gestattete. Zur Klärung dieser Frage wurden *Physalis floridana* mit deutlichen TÄV-Symptomen vier Monate nach der Erstinfektion mit dem A-Virusstamm „Sabina g" eingerieben. Dieser Stamm hat im Gegensatz zu „P 716/12" die Fähigkeit, auf *Physalis floridana* nekrotische Lokalläsionen hervorzurufen. Ebenso wie die K/Sabina bildeten auch die TÄV/Sabina-Pflanzen Lokalläsionen aus. Auch in diesem Fall waren an

den erstgenannten zahlreichere nekrotische Flecke zu beobachten. Infolge unterschiedlicher Blattgröße und verhältnismäßig geringer Läsionsanzahl unterblieb jedoch eine quantitative Auswertung.

In weiteren Versuchen wurden sowohl der Stamm „P 716/12" als auch „Sabina g" auf TÄV-kranke Samsun verimpft. Wie bei Zweitinfektionen durch normale Y-Virusstämme traten auch bei Zweitinfektionen mit dem A-Virus keine Veränderungen der TÄV-Symptome ein. Die A-Virusstämme konnten aber stets in den Folgeblättern des Samsuntabaks an Hand der auf „A 6" im Schalentest gebildeten Läsionen nachgewiesen werden. Nahezu in jedem Fall war die Anzahl der Einzelherde bei TÄV/A-Virus-Preßsaft deutlich geringer als bei K/A-Virus-Preßsaft. Den Befund eines derartigen Versuches gibt Tabelle 7 wieder; Abbildung 6 veranschaulicht ein solches Ergebnis.

Tabelle 7

Konzentration des Kartoffel-A-Virus in Folgeblättern verschiedenen Alters von TÄV-erstinfizierten Pflanzen

Versuchspflanze: Tabak, Sorte „Samsun"

Erstinfektion mit TÄV: 10. November 1958

Zweitinfektion mit „Sabina g": 23. Januar 1959

Prüfung am 28. Februar 1959 auf Blättern des *Solanum demissum*-Bastards „A 6" im Schalentest (unverdünnter Preßsaft)

Infektion	Alter der geprüften Blätter	Durchschnittliche Läsionsanzahl je Blatthälfte
K/Sabina	jung	73*)
TÄV/Sabina	jung	44
K/Sabina	alt	40
TÄV/Sabina	alt	16

*) Es wurden von denselben Pflanzen jüngere Blätter mit deutlichen Symptomen des A-Virus bzw. TÄV und ältere Blätter mit undeutlich gewordenen Krankheitserscheinungen entnommen. Alle diese Blätter waren unter dem Einfluß einer systemischen Infektion mit „Sabina g" aufgewachsen.

B. Erstinfektionen mit dem Bilsenkrautmosaik-Virus

Infektionen mit dem BMV schädigen „Samsun" und andere Tabaksorten meist sehr stark; oft gehen die Pflanzen nach kurzer Zeit ein. Deshalb diente *Physalis floridana* als Versuchspflanze, die auf BMV-Infektionen ausschließlich mit Mosaikbildung reagiert.

Physalis floridana, am 6. Januar 1959 mit BMV infiziert, wurde zusätzlich am 14. Februar 1959 mit dem normalen Stamm „Y III" des Kartoffel-Y-Virus eingerieben. Nach 14 Tagen waren Läsionen erkennbar (Abb. 2). Die Bonitierung vier Wochen nach der Zweitinfektion ergab, daß sich das Y-Virus systemisch ausgebreitet hatte. K/Y III-Pflanzen zeigten jedoch stärkere Nekrosen als die entsprechenden BMV/Y III-Pflanzen.

C. Erstinfektionen mit Stämmen des Kartoffel-Y-Virus

Eine Reihe von Tabakpflanzen wurde nach Erstinfektion durch Normal- oder Rippenbräune-Stämmen mit BMV und auch mit Y-Virusstämmen zweitinfiziert. Fast immer ohne merkliche Konzentrationsminderung konnte sich das BMV in jedem Fall gegenüber M 3, Wi, Y I, Y III und TEB durchsetzen. Als Beispiel ist in Tabelle 8 die Infektion Wi/BMV aufgeführt.

Tabelle 8

Konzentration des Bilsenkrautmosaik-Virus in „Wi"-erstinfizierten Pflanzen

Versuchspflanze: Tabak, Sorte „Wohlsdorfer Burley"
Erstinfektion mit Tabakrippenbräune-Stamm „Wi": 11. September 1956
Zweitinfektion mit BMV: 9. Oktober 1956
Prüfungstermin: 29. Oktober 1956

Infektion	Testpflanze	Preßsaftverdünnung 10^{-2}	Preßsaftverdünnung 10^{-3}
K/BMV	„V 20" und „Virgin Gold A"	121*)	18
Wi/BMV	„V 20" und „Virgin Gold A"	155	17

*) Durchschnittliche Anzahl der Lokalläsionen je Blatt.

In früheren Versuchen war festgestellt worden, daß eine Erstinfektion mit normalen Stämmen des Kartoffel-Y-Virus eine Zweitinfektion mit dem Stamm „M 3" der Tabakrippenbräune meist nicht verhindert (KLINKOWSKI und SCHMELZER 1957). Jetzt konnte bei Umkehr der Reihenfolge das gleiche Resultat erzielt werden: In Folgeblättern von Samsuntabak war selbst bei

Tabelle 9

Konzentration des Tabakrippenbräune-Stammes „M 3" und des normalen Y-Virusstammes „TEB" nach zeitlich abgestufter Infektion

Versuchspflanze: Tabak, Sorte „Samsun"
Erstinfektion mit „M 3": 28. September 1956
Zweitinfektion mit „TEB": 18. Oktober 1956
Prüfungstermin: 19. November 1956

Infektion	Testpflanze	Preßsaftverdünnung 10^{-1}	Preßsaftverdünnung 10^{-2}	Nachzuweisendes Virus
M 3/K	„V 20"	—	0/3*)	TEB
	Virgin Gold A	—	3/3	M 3
M 3/TEB	„V 20"	3/3	3/3	TEB
	Virgin Gold A	3/3	3/3	M 3 (TEB wird überdeckt)
K/TEB	„V 20"	3/3	3/3	TEB

*) Der Zähler gibt die Anzahl der infizierten, der Nenner die Anzahl der beimpften Pflanzen an.

einer Verdünnung von 10^{-3} der zweitverimpfte Stamm „TEB" mit Hilfe des Tabakzuchtstammes „V 20" noch festzustellen (Tab. 9). Auch der Stamm „M 1" vermochte sich auf „Samsun" gegenüber „M 3" durchzusetzen.

Eine „M 3"-Erstinfektion an Samsun verhinderte sogar nicht die Zweitinfektion mit dem Tabakrippenbräune-Stamm „Wi". Selbst in einer Verdünnung von 10^{-3} war „Wi" in mischinfizierten Pflanzen nachweisbar. Ein reziproker Versuch mit diesen Virusstämmen konnte mit Hilfe von *Petunia hybrida* geprüft werden, weil nur „M 3", nicht dagegen „Wi" deutliche chlorotische bis nekrotische Lokalläsionen verursacht (Schmelzer und Klinkowski 1958); beide Stämme bewirken jedoch auch systemische Infektionen.

Je sechs Petunien wurden am 27. Oktober 1956 mit „Wi" bzw. Preßsaft einer gesunden Kontrollpflanze an mehreren Blättern eingerieben. Am 19. November 1956 erfolgte an je drei eingeriebenen und drei Folgeblättern eine Zweitinfektion mit „M 3". An den Wi/M 3-Folgeblättern trat im Vergleich zu den K/M 3-Folgeblättern nur $^1/_{30}$ an Läsionen auf, so daß man von einem gewissen Prämunitätseffekt sprechen kann (Tab. 10). Eindeutig geht aus dem Versuch hervor, daß die mit „Wi" eingeriebenen Blätter nicht so gut vor „M 3" geschützt waren wie die Folgeblätter (Abb. 7). Vermutlich vermochte das erstverimpfte Vi-

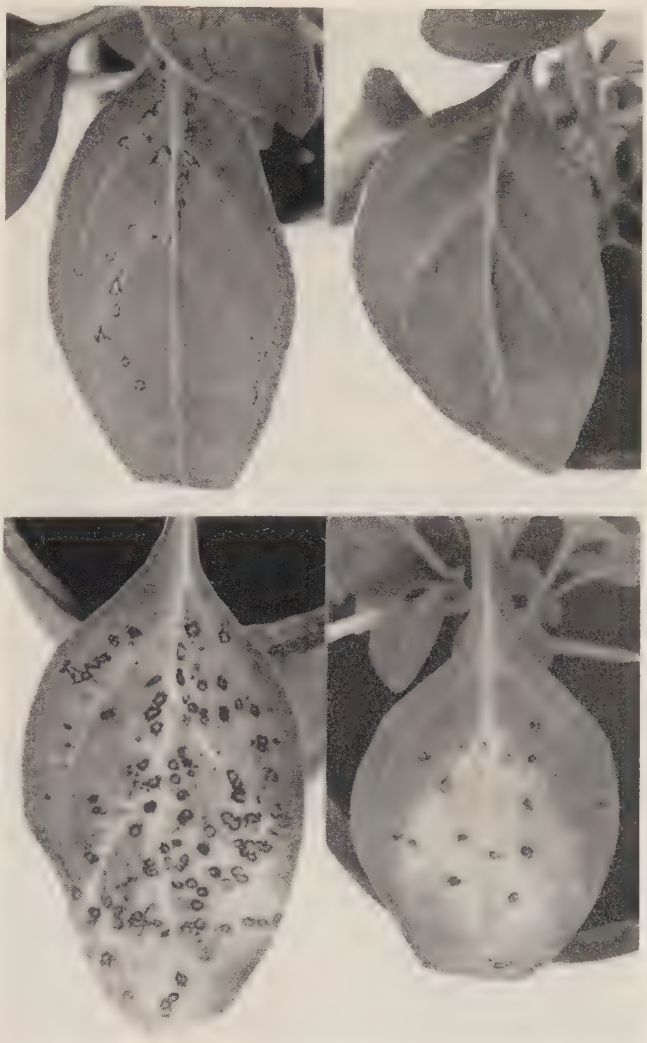

Abb. 7. Blätter von *Petunia hybrida*. Jeweils links: K/M 3, rechts: Wi/M 3; oben: systemisch durch „Wi" infiziert, unten: durch direkte Beimpfung mit „Wi" infiziert. Erstinfektion: 27. Oktober 1956, Zweitinfektion: 19. November 1956, photographiert: 6. Dezember 1956

rus nicht alle Zellen der zum Zeitpunkt der Erstinfektion bereits weitgehend ausgewachsenen Blätter zu besiedeln. Zwei Monate nach der Beimpfung mit „M 3" waren sämtliche K/M 3-Petunien durch das Virus abgetötet, während die Wi/M 3-Pflanzen ein starkes Mosaik zeigten.

Abb. 8. Die Wirkung von Infektionen mit reinen Viren und Mischungen der Tabakätzmosaik-Gruppe auf *Nicotiana glutinosa* bzw. *N. tabacum*, Sorte „Samsun". Jeweils links: mit virusfreiem Preßsaft abgeriebene Kontrollpflanze. Die übrigen Pflanzen von links nach rechts. A: TÄV, TÄV + BMV, BMV (Infektion: 8. August, Aufnahme: 20. September 1957), B: Y III, Y III + TÄV, TÄV (Infektion: 8. August, Aufnahme: 20. September 1957), C: Y III, Y III + TÄV, TÄV (Infektion: 21. August, Aufnahme: 4. Oktober 1957)

Abb. 9. Die Wirkung von Infektionen mit reinen Viren und Mischungen der Tabakätzmosaik-Gruppe auf *Nicotiana glutinosa* bzw. *N. tabacum*, Sorte „Samsun". Jeweils links: mit virusfreiem Preßsaft abgeriebene Kontrollpflanze. Die übrigen Pflanzen von links nach rechts: A: Y III, Y III + BMV, BMV (Infektion: 8. August, Aufnahme: 3. September 1957), B: Y III, Y III + BMV, BMV (Infektion: 21. August, Aufnahme 4. Oktober 1957), C: M 3, M 3 + BMV, BMV (Infektion: 8. August, Aufnahme: 27. August 1957), D: M 3, M 3 + BMV, BMV (Infektion: 8. August, Aufnahme: 20. September 1957)

Weitere Versuche gingen von der Tatsache aus, daß bestimmte Y-Virusstämme keine Läsionen an den eingeriebenen Blättern, sondern lediglich Mosaikerscheinungen und unbedeutende Nekrosen an den Folgeblättern von *Physalis floridana* bewirken, während andere sowohl an eingeriebenen als auch an Folgeblättern starke Absterbeerscheinungen hervorrufen.

Tabelle 10

Einfluß einer Erstinfektion mit dem Tabakrippenbräune-Stamm „Wi" auf die Zweitinfektion mit „M 3"

Versuchspflanze: *Petunia hybrida*
Erstinfektion mit „Wi": 27. Oktober 1956
Zweitinfektion mit „M 3": 19. November 1956

Infektion	Art der Erstinfektion der Blätter	
	abgerieben	systemisch infiziert
K/M 3	48,8*)	32,3
Wi/M 3	8,8	1,0

*) Durchschnittliche Anzahl der „M 3"-Läsionen je Blatt.

Zwei Monate vorher mit „YS" („necrotic fleck strain" des Kartoffel-Y-Virus) infizierte *Physalis floridana* wies nach einer Zweit-Beimpfung mit „Y III" zwar etwas verspätet und in geringerer Anzahl Lokalläsionen auf, jedoch vermochte sich der zweite Virusstamm auch systemisch durchzusetzen. Mit den eng untereinander verwandten Tabakrippenbräune-Stämmen „Wi" und „Lü A" erstinfizierte *Physalis floridana* zeigte dagegen keine Läsionen nach Beimpfung mit „Y III".

D. Mischinfektionen

Um zu prüfen, ob sich die Viren der Tabakätzmosaik-Gruppe auch bei gleichzeitiger Verimpfung gegeneinander durchzusetzen vermögen, wurden einige Versuche mit paarweise gemischten Inocula auf *Nicotiana glutinosa* und Samsuntabak durchgeführt. Zum Vergleich wurden Reinkulturen der entsprechenden Viren und gesunde Kontrollpflanzen herangezogen.

Wenn das BMV die eine Mischungskomponente darstellte, so zeigten die Pflanzen vorwiegend die Krankheitserscheinungen dieses Virus; selbst ein so stark schädigendes Virus wie das TÄV mußte dann im Symptombild zurücktreten (siehe Abb. 8 A). Wenn ein Normal- oder Rippenbräune-Stamm des Y-Virus an der Mischung beteiligt war, konnten die BMV-Symptome anfangs abgeschwächt werden (vgl. Abb. 9 A und 9 C). Nach längerer Zeit (6 Wochen und mehr) wirkte sich jedoch die Mischinfektion stärker schädigend aus (s. Abb. 9 B und 9 D). Auch die Zumischung von „Y III" und „M 3" zu TÄV verursachte im Endeffekt eine stärkere Wuchsdepression (Abb. 8 B und C). Die Kombination von „M 3" und TÄV ließ an verschiedenen Blättern ein neues Krankheitsbild entstehen (vgl. Abb. 10). Die nach unten gekrümmten

älteren Folgeblätter zeigten eine auffällige weißliche Adernbänderung. — Beimischungen des Kartoffel-A-Virusstammes „Magna 556" zu anderen Angehörigen der Tabakätzmosaik-Gruppe wirkten sich nicht im Symptombild aus.

Abb. 10. Folgeblätter des Samsuntabaks, 25 Tage nach Infektion. Links: Mischinfektion mit TÄV und Tabakrippenbräune-Stamm „M 3", rechts: TÄV allein

IV. DISKUSSION DER VERSUCHSERGEBNISSE

Die Versuche zahlreicher Autoren haben ergeben, daß innerhalb der Stämme des Kartoffel-Y-Virus Prämunitätserscheinungen häufig ausbleiben. Im Jahre 1940 stellten Smith und Dennis fest, daß ein normaler Y-Stamm den Befall mit einer nekrotischen Variante des gleichen Virus nicht abwehren konnte. Ähnliche Versuche von Nobrega und Silberschmidt (1944) führten zu keinem eindeutigen Ergebnis. Bawden und Kassanis (1951) konnten Tabakpflanzen, die mit einem normalen Y-Stamm oder der Variante „C" dieses Virus erstinfiziert waren, ohne Schwierigkeiten mit einem Tabakrippenbräune-Stamm zweitinfizieren. Ebenso waren durch Tabakrippenbräune befallene *Nicotiana glutinosa* und Kartoffelpflanzen nicht vor einem normalen Y-Stamm und der Variante „C" geschützt. Mehrere Stämme des Kartoffel-Y-Virus verhinderten nicht das Eindringen und die Vermehrung eines Rippenbräune-Stammes in Versuchen von Munro (1955). Einige andere normale Stämme unterbanden jedoch bis zu einem gewissen Grade die Rippenbräune-Infektion. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen Klinkowski und Schmelzer (1957). Silberschmidt (1957) konnte nachweisen, daß mehrere auf Tabak nekrotische Reaktionen hervorrufende Stämme des Kartoffel-Y-Virus die Tomate nicht vor normalen Stämmen prämunisierten. Neuerdings stellte Richardson (1958) in Übereinstimmung mit anderen Autoren fest, daß nor-

male Stämme und die Variante „C" den Tabak nicht vor Rippenbräune schützen, während andere mehr oder weniger eine Prämunität vermitteln. Umgekehrt war durch Rippenbräune infizierte *Physalis floridana* für normale Stämme des Y-Virus anfällig, obgleich reziprok zum Teil eine Schutzwirkung zu beobachten war. Durch die Variante „C" befallene Pflanzen zweier Kartoffelsorten konnten von der Rippenbräune nicht angegriffen werden. Ein auf *Physalis floridana* nichtnekrotische Symptome hervorrufender normaler Stamm wehrte nur einen von fünf normalen Stämmen ab.

Aus den erwähnten Arbeiten ergeben sich folgende vier Gesichtspunkte: 1. Normale Y-Stämme wehren die Rippenbräune-Stämme im allgemeinen nicht ab. 2. Die Rippenbräune-Stämme üben keine Schutzwirkung gegenüber normalen Stämmen aus, selbst wenn reziprok gelegentlich Prämunitätserscheinungen auftreten. 3. Die Prämunitätswirkung kann von der Pflanzenart abhängen (Variante „C" schützt die Kartoffel, nicht jedoch den Tabak, vor Rippenbräune). 4. Auch zwischen normalen Y-Stämmen können die Prämunitätserscheinungen ausbleiben.

Diese Punkte konnten zum Teil durch unsere Untersuchungen bestätigt werden, so ergaben z. B. M 3/TEB oder M 3/M 1 keine Prämunität. Die Erstinfektion mit Rippenbräune-Stämmen kann aber zur Abwehr eines normalen Y-Stammes führen (Wi/Y III bzw. Lü A/Y III). Zwischen verschiedenen Rippenbräune-Stämmen braucht keine Prämunitätswirkung aufzutreten (M 3/Wi); sie kann jedoch reziprok vorhanden sein (Wi/M 3), wobei möglicherweise die Pflanzenart eine Rolle spielt (M 3/Wi wurde an Tabak, Wi/M 3 an *Petunia hybrida* untersucht). Inwieweit das Vorhandensein bzw. Fehlen der Prämunitätserscheinungen engere oder weitere Verwandtschaftsbeziehungen zwischen den Y-Virusstämmen anzeigt, muß in späteren serologischen Untersuchungen geklärt werden.

In Anbetracht des geschilderten häufigen Ausbleibens von Prämunitätserscheinungen zwischen Stämmen des Kartoffel-Y-Virus ist es nicht erstaunlich, daß zwischen den untersuchten, zur Tabakätzmosaik-Gruppe gehörigen Virus a r t e n keine Interferenzerscheinungen in dem Sinne bestanden, daß das eine Virus die Infektion durch das andere verhinderte oder es im Laufe der Zeit vollständig unterdrückte. Unsere Untersuchungen führten also zu wesentlich anderen Ergebnissen als die von BAWDEN und KASSANIS (1941, 1945). Welche Gründe können zur Erklärung der unterschiedlichen Befunde herangezogen werden?

Die genannten Autoren stellten — wie eingangs schon gesagt — fest, daß nur der starke Stamm des TÄV (severe etch strain), nicht dagegen der milde Stamm (mild etch strain) zur vollständigen Unterdrückung des Kartoffel-Y-Virus und des BMV befähigt ist. Es bleibt daher zu diskutieren, ob der uns vorliegende Stamm des TÄV tatsächlich der starke Stamm war. Wie bereits früher erwähnt (SCHMELZER und KLINKOWSKI 1959), überließ uns BAWDEN freundlicherweise das Material zweimal unter der Bezeichnung „tobacco severe etch virus". Nach Passage über *Datura stramonium* verwendeten wir beide Subkulturen zu den Versuchen, wobei wir zwischen ihnen keinen

Unterschied feststellen konnten. Den erbetenen milden Stamm erhielten wir nicht, da er in Rothamsted nicht mehr vorhanden war.

Gegen die Annahme, daß der in unseren Versuchen verwendete Stamm mit dem „mild etch strain" identisch ist, sprechen folgende Tatsachen: 1. Im Gegensatz zum starken Stamm des TÄV verursacht der milde für gewöhnlich nur ein bis zwei Kristalle in einem Zellkern (Bawden und Kassanis 1941). Wir beobachteten im allgemeinen eine größere Anzahl derartiger Einschlußkörper je Nucleus. 2. Die mit unserem TÄV infizierten Samsun- bzw. *Nicotiana glutinosa*-Pflanzen waren mehr oder weniger stark gestaucht und verkleinert mit meist deformierten Blättern. Für den milden Stamm ist charakteristisch, daß die kranken Pflanzen etwa gleich groß und normal entwickelt wie die entsprechenden Kontrollen bleiben (Bawden und Kassanis 1941). 3. Unser TÄV-Stamm erzeugte auf *Physalis peruviana* Lokalläsionen mit einem nekrotischen Zentrum (s. Abb. 1). Bei jüngeren Pflanzen breiteten sich die Nekrosen für gewöhnlich auch auf Folgeblättern aus. Dagegen ruft der milde Stamm des Virus nur gelegentlich nekrotische Reaktionen an dieser Testpflanze hervor; im allgemeinen verursacht er eine nichtnekrotische Schekkung (Holmes 1942).

Nicht auszuschließen ist, daß sich der starke Stamm des TÄV im Laufe der Kultur im Gewächshaus von 1945 bis 1956 verändert und daher die Fähigkeit zur vollständigen Unterdrückung des Kartoffel-Y-Virus und des BMV verloren hat. Ebenso ist denkbar, daß sich der von Bawden und Kassanis verwendete Stamm des Kartoffel-Y-Virus vom TÄV leicht unterdrücken ließ, ein Merkmal, das den normalen Y-Stämmen ebenso wie den Rippenbräune-Stämmen im allgemeinen nicht zukommen dürfte, da wir es bei keinem von 8 normalen Stämmen beobachteten. Theoretisch könnte sich auch das BMV verändert haben, so daß es nicht mehr durch das TÄV abgewehrt werden kann.

Allerdings halten wir derartige Eigenschaftsänderungen der geprüften Viren für wenig wahrscheinlich und möchten eher die verschiedenen Nachweismethoden und Testpflanzenarten für die unterschiedlichen Ergebnisse verantwortlich machen. Zum Beispiel wird der Tabakzuchtstamm „V 20" als Indikator für das Y-Virus vermutlich stärker anfällig sein als die von Bawden und Kassanis verwendeten Kartoffelsorten.

Die unterschiedlichen Resultate der serologischen Prüfungen scheinen ebenfalls auf methodische Differenzen zurückzuführen sein, da Bawden und Kassanis nicht immer geklärte Säfte und außerdem niedrigtitrige Seren verwandt haben.

Häufig haben die genannten Autoren zur Reisolierung der Viren Blattläuse benutzt. Es wäre interessant, durch entsprechende Versuche festzustellen, ob die Blattläuse gegebenenfalls die drei Viren aus mischinfizierten Pflanzen verschieden leicht aufzunehmen bzw. zu übertragen vermögen. Dabei könnte eine unterschiedliche Verteilung der Viren im Pflanzengewebe eine Rolle spielen.

Aus den vorliegenden Versuchen, einschließlich der serologischen Prüfungen, geht zweifelsfrei hervor, daß die Gegenwart des TÄV die Konzen-

tration des Y- und A-Virus und des BMV zwar herabsetzt; eine völlige Unterdrückung, wie sie von BAWDEN und KASSANIS beobachtet wurde, hat sich jedoch in keinem Fall ergeben.

Für Mithilfe bei der Durchführung der Versuche danken wir Frau K. BEYER, Fräulein H. NEUGEBAUER und Fräulein M. BÄTGE.

Zusammenfassung

Erstinfektionen mit dem starken Stamm des Tabakätzmosaik-Virus (TÄV) schützten Samsuntabak nicht vor Zweitinfektionen mit verschiedenen Tabakrippenbräune- und normalen Stämmen des Kartoffel-Y-Virus. In den Folgeblättern war mit Hilfe von Differentialwirten und serologischen Untersuchungen das zweitverimpfte Virus gut nachweisbar. Die Konzentration des zweitverimpften Virus war im Vergleich zu den Reinkulturen geringer, mitunter konnte auch das TÄV in seiner Konzentration vermindert sein.

Die mit normalen Y-Virusstämmen zweitinfizierten Pflanzen zeigten keine zusätzlichen Symptome, die Zweitinfektion mit Rippenbräune-Stämmen wurde dagegen auch äußerlich neben dem TÄV deutlich kenntlich.

An TÄV-erstinfizierter *Physalis floridana* wurden die Lokalläsionen und systemischen Nekrosen zweitverimpfter normaler Stämme des Kartoffel-Y-Virus gut sichtbar, wenngleich entsprechende Kontrollpflanzen durch die Y-Virusinfektion allein stärker geschädigt wurden.

Auch das Bilsenkrautmosaik-Virus (BMV) konnte durch das TÄV im Samsuntabak nicht abgewehrt, sondern nur in seiner Konzentration vermindert werden. Die Konzentration des TÄV ging dabei ebenfalls zurück.

Das Kartoffel-A-Virus vermochte sich in Versuchen mit dem *Solanum demissum*-Bastard „A 6", *Physalis floridana* und Samsuntabak gegenüber dem TÄV durchzusetzen.

Erstinfektionen an *Physalis floridana* mit BMV schützten nicht vor Zweitinfektionen mit einem normalen Stamm des Kartoffel-Y-Virus, jedoch milderte auch das BMV die Schädigung durch das Y-Virus.

Die untersuchten Rippenbräune- und normalen Stämme des Kartoffel-Y-Virus waren nicht zur Abwehr des BMV befähigt. Die BMV-Konzentration der Preßsäfte von Y-Virus-erstinfizierten Pflanzen war im allgemeinen so hoch wie die der Kontrollpflanzen.

Mit Hilfe von Differentialwirten gelang der Nachweis, daß der Rippenbräune-Stamm „M 3" dem Samsuntabak keinen wirksamen Schutz vor Infektionen mit normalen Y-Stämmen verleiht. Der genannte Stamm zeigte sogar keine Prämunitätswirkung gegenüber dem Stamm „Wi" der Rippenbräune. Bei reziproker Infektion — also „Wi" vor „M 3" — ergab sich jedoch eine mehr oder minder ausgeprägte Prämunität.

Der aus Südamerika stammende „necrotic fleck strain" schützte *Physalis floridana* nicht hinreichend vor dem nachfolgenden normalen Y-Stamm „Y III". Durch die Rippenbräune-Stämme „Wi" bzw. Lü A" erstinfizierte

Physalis floridana zeigten dagegen keine Symptome einer Zweitinfektion mit „Y III".

Paarweise durchgeführte Mischinfektionen an Samsuntabak bzw. *Nicotiana glutinosa* ließen am Symptombild erkennen, daß die Angehörigen der Tabakätzmosaik-Virusgruppe nicht vom TÄV vollständig unterdrückt werden können. Auch bei Mischinfektionen mit dem BMV war die Wirkung der Partner meist sichtbar. In Mischungen mit dem Kartoffel-A-Virus wurde das Krankheitsbild ausschließlich von der jeweiligen Mischungskomponente bestimmt.

Die zu diesen Befunden im Gegensatz stehenden Resultate von Bawden und Kassanis (1941, 1945) werden diskutiert.

Summary

Interference between viruses of the tobacco etch mosaic group

Primary infections with the severe strain of tobacco etch mosaic virus (TEV) did not protect Samsun tobacco against secondary infections with various tobacco veinal necrosis strains and normal strains of potato virus Y. In the newly formed leaves the secondarily inoculated virus was easily detectable by means of differential hosts and serological experiments. The concentration of the second virus was lower in comparison with pure cultures and TEV was frequently reduced in concentration at the same time.

Plants secondarily infected with normal strains of virus Y showed no supplementary symptoms whereas secondary infection with veinal necrosis strains was clearly detectable externally in addition to the TEV.

On plants of *Physalis floridana* primarily infected with TEV the local lesions and systemic necroses of secondarily infected normal strains of potato virus Y were clearly visible, although corresponding control plants infected with virus Y alone were nevertheless more severely damaged.

Hyoscyamus mosaic virus (HMV) was also not protected by TEV but only reduced in concentration. The concentration of TEV was also reduced at the same time.

Potato virus A could establish itself in the presence of TEV in experiments with *Solanum demissum* hybrid "A 6", *Physalis floridana*, and Samsun tobacco.

Primary infections of *Physalis floridana* with HMV did not give protection against secondary infections with a normal strain of potato virus Y though HMV also reduced the severity of the damage by virus Y.

The veinal necrosis and normal strains of potato virus Y studied were not capable of protecting against HMV. The concentration of HMV in expressed sap from plants primarily infected with virus Y was as high as in the control plants.

By means of differential hosts it was evident that veinal necrosis strain "M 3" did not protect Samsun tobacco from infections with strains of virus Y. The strain in question even failed to show any cross protection effect

towards the "Wi" strain of veinal necrosis. In reciprocal infections — i. e. "Wi" before "M 3" — evidence of cross protection became more or less distinct.

The "necrotic fleck strain" originating in South America gave no complete protection against succeeding infections with "Y III", a normal strain of virus Y. On the other hand plants of *Physalis floridana* primarily infected with veinal necrosis strains "Wi" or "Lü A" showed no symptoms when secondarily infected with "Y III".

Mixed infections carried out in pairs on Samsun tobacco or *Nicotiana glutinosa* gave symptoms showing that the strains belonging to the tobacco etch virus group cannot be fully suppressed by TEV. In mixed infections with HMV too the effect of both partners was generally detectable. In mixtures with potato virus A the symptoms were determined exclusively by the other component of the mixture.

The results of Bawden and Kassanis (1941, 1945), which are not in agreement with the present findings, are discussed.

Literaturverzeichnis

Bartels, R., 1957: Ein Beitrag zum serologischen Nachweis des Y-Virus in der Kartoffel. Phytopath. Z. **30**, 1—16.

Bawden, F. C., and B. Kassanis, 1941: Some properties of tobacco etch viruses. Ann. appl. biol. **28**, 107—118.

— —, and — —, 1945: The suppression of one plant virus by another. Ann. appl. biol. **32**, 52—57.

— —, and — —, 1951: Serologically related strains of potato virus Y that are not mutually antagonistic in plants. Ann. appl. biol. **38**, 402—410.

Holmes, F. O., 1942: Quantitative measurement of a strain of tobacco-etch virus. Phytopathology **32**, 1058—1067.

— —, 1948: The filterable viruses. Baltimore.

Klinkowski, M., und K. Schmelzer, 1957: Beiträge zur Kenntnis des Virus der Tabak-Rippenbräune. Phytopath. Z. **28**, 285—306.

Munro, J., 1955: The reactions of certain solanaceous species to strains of potato virus Y. Canad. j. bot. **33**, 355—361.

Nobrega, N. R., e K. Silberschmidt, 1944: Sobre uma provavel variante do virus „Y" da batatinha (*Solanum* virus 2 Orton) que tem a peculiaridade de provocar necroses em plantas de fumo. Arq. inst. biol. São Paulo **15**, 307—330.

Richardson, D. E., 1958: Some observations on the tobacco veinal necrosis strain of potato virus Y. Plant Pathology **7**, 133—135.

Schmelzer, K., und M. Klinkowski, 1958: Ein neuer Stamm des Tabakrippenbräune-Virus in Mitteldeutschland. Naturwissenschaften **45**, 62.

— —, und — —, 1959: Die Reaktion einiger Tabaksorten und Differentialwirte gegenüber den Viren der Tabakätzmosaik-Gruppe. Zugleich ein Beitrag zur Kenntnis der Stämme des Kartoffel-Y-Virus. Züchter **29**, 229—237.

Silberschmidt, K., 1957: Prämunitätsversuche mit verschiedenen Stämmen des Kartoffel-Y-Virus (einschließlich des Erregers der Tabakrippenbräune). Kurzfass. Vortr. IV intern. Pflanzensch.-Kongr. Hamburg 1957, 46—47.

Smith, K. M., and R. W. G. Dennis, 1940: Some notes on a suspected variant of *Solanum* virus 2 (potato virus Y). Ann. appl. biol. **27**, 65—70.

Dept. of Plant Physiology, University of Lausanne (Switzerland)

Auxin content and auxin catabolism of the stems of *Euphorbia cyparissias* L. infected by *Uromyces pisi* (Pers.)

By

P.-E. Pilet

With 4 figures

I. INTRODUCTION

A large number of publications on physiological and biochemical study of infected tissues by fungi in higher plants has been produced. A few recent and general works will be mentioned (Allen 1954, Kern 1956, Chevaugeon 1957, Gruen 1959, Rohringer 1959).

Let us enumerate some of the few studies dealing with auxins metabolism in infected plants.

Zimmermann, in 1936 already, notices that stems of *Euphorbia cyparissias* infected by *Uromyces pisi* contained ten times as much auxins as did healthy stems. Moulton and Link (1940) and Moulton (1942) observe a marked auxin content in the stems of *Zea mays* infected by *Ustilago zeae*. Wolf (1952) confirms this observation. Pilet (1952) finds out that, if there are only few extractible auxins in *Sempervivum tectorum* leaves, the presence of *Endophyllum sempervivi* caused considerable increase of hormone content. Repeating these experiments on *Euphorbia cyparissias* infected by *Uromyces pisi*, Pilet (1953) notes again that presence of fungus caused a marked increase of auxins content.

These facts may be explained by the following hypothesis.

1. the fungus synthetizes auxins and this production increases endogenous auxins concentration in infected tissues;
2. the infected plant reacts and produces auxins in excess, hence increase of hormone content;
3. the parasite yields special substances which cause the activation of auxins precursors and consequently increase auxin concentration.

Similar research work has been undertaken on several kinds of material (for instance *Gymnosporangium havaeanum* infected by a *Puccinia*) by

HIRATA (1954) who confirms these preceding observations. WOLF (1956) taking up again our datas (PILET 1953) tries to demonstrate our first hypothesis is very likely the only plausible explanation for the observed phenomenons. He cultivates the parasite — exempt of host — in order to prove its ability to produce auxins. By chromatography, he analyzes the hormone content of infected leaves and obtains very nearly the same values with *Juniperus virginiana* as the ones obtained with *Euphorbia cyparissias* (PILET 1953).

The first results induced us to take up again the problem, but this time, viewing the catabolism of auxins in infected tissues (PILET 1957). It led us to the following conclusions:

1. the activity of IAA-oxidases (enzymes regulating the inactivation of β-indolyl-acetic acid : IAA) is permanently stronger with healthy than with contaminated leaves;
2. these enzymes are certainly inhibited in infected leaves. This inhibition moreover is optimum in the regions with the highest density of fungus-growth;
3. IAA-oxydases activity inside ecidian conceptacle being more or less constant; the variations observed between healthy and diseased leaves could not be attributed to the differences of action of the parasite's enzymes since wherever the fungus most abounds, enzymes of leaf extracts are not especially active;
4. the inhibition of IAA-oxidases activity must be considered as the primary phenomenon and the increase in auxin rate in the diseased leaves is its immediate consequence. The fungus is responsible for this decrease in enzymatic activity. The hypothesis that the parasite would be the source of toxins crippling the IAA-oxidase must be retained and one could consider this secretion as a genuine anti-auxin-oxidasic system.

SHAW and HAWKINS (1958) studied the auxin content in two wheat varieties infected by *Puccinia graminis tritici*, using the *Avena* section test on paper chromatograms of extracts. Diseased and healthy leaves gave auxin with the same Rf as IAA. After 11 days of incubation, the IAA level of the diseased leaves was 20 times greater than in healthy leaves. Similar results were obtained with barley leaves infected by *Erysiphe graminis hordei*. Then, the authors presented some results on the destruction of IAA labelled with C^{14} (as — $C^{14}OOK$) : leaf discs were incubated with IAA and the radioactivity released as $C^{14}O_2$ was measured. The ability of the tissues to decarboxylate the IAA increased sharply in the first 3 days after inoculation. With susceptible hosts, this increase was followed by an almost equally sharp decrease to less than 50 % of the values for uninfected tissues. DALY and INMAN (1958) tested the auxins in ether extracts of healthy and diseased hypocotyls (*Carthamus tinctoria* infected by *Puccinia carthami*) with the *Avena* section test after chromatographic separation. Diseased hypocotyls (12 days after infection) showed more IAA than healthy ones ($10.2 \cdot 10^{-4}$ μg

IAA/hypocotyl for $2.3 \cdot 10^{-4}$ μg IAA). The infected hypocotyls also contained other compounds giving growth activity, at least one above and a lesser one below the IAA region of the chromatograms.

II. MATERIAL AND METHODS

Plants used are *Euphorbia cyparissias* L. infected by *Uromyces pisi* (Pers.) de By. The following results have been obtained by analysis of healthy and infected stems. A comparison will be established between present datas and previous observations (Pilet 1957) with infected leaves from the same material. We may add that measurements essentially dealt with:

a) non-infected plants (control);
b) recently infected plants where mycelium stage of parasite fungus alone has been isolated;
c) diseased plants where aecidiospores stage is clearly visible on leaves.

A. Auxin content

1. Extraction

Except for a few slight modifications, we will use a settled technic for extraction of auxins in *Lens* (Pilet 1958). The following solvant was employed: ether absolutely free from any trace of peroxide (treated with CaO and $FeSO_4$), then distilled.

Free auxins' fraction: about 100 g of fresh stems are crushed with above mentioned ether (150 ml); it should stay in darkness (+ 1 °C) for 12 hours, then subjected to centrifugation (4000 g; 10 min.) and washed 3 times with ether; then made up to 300 ml.

Acid auxins' fraction: out of the preceding fraction, 60 ml should be concentrated by distillation up to 5 ml; an aqueous solution of $NaHCO_3$ 0.5 M should be added up to a pH of 8.6 then shaked. The aqueous fraction should be separated from the etheral fraction. The former one only is used and acidified with HCl 0.5 n up to a pH of 3.5. This acid fraction is wasted by the ether and one obtains an extract of 15 ml corresponding to the ether acid fraction of free auxins.

2. Bioassays

Two distinct kinds of tests work out to obtain biological measurements of the activity of isolated auxin compounds.

Root test (R) (Pilet 1958): 100 fragments of *Lens* roots, (5 mm) are placed in an aqueous solution of glucose ($5 \cdot 10^{-6}$ M) with a pH equal to 5.7. After 48 hours (culture in darkness, and at 20.5 °C, on plastic support and filter paper) elongation measurements take place. A greater sensitiveness can be obtained in this test by means of few modifications (Pilet, Kobr and Siegenthaler 1960).

A buffer solution Na_2HPO_4/KH_2PO_4 (pH: 5.1) is used in which saccharose (1 %) is dissolved. Root tips (3 mm) are used and elongation measured after 12 hours. Values (in %) obtained are alike, but the second test is much more sensitive than the first one.

Stem test (T) (PILET 1958; PILET and COLLET 1959): 60 fragments of *Lens* stems, (5 mm) are placed in 4 ml of aqueous solution of saccharose ($6—10^{-2}$ M) with a pH equal to 6.1. After 9 hours (culture in darkness and at immersion and agitation, 25 °C) elongation measurements take place.

3. Chromatographic separation

Our technic has been previously published (PILET 1958), here is a summary:

Descending chromatography is worked on Whatman paper no. 1, using the chromatobox of PLEUGER. With a syringe (micrometer Agla) the active mixture is placed on the paper. Then paper is dried and put into the chromatobox. Next the following separation with solvant takes place:

isopropanol (80 %),

28 % NH_3 10 %,

bidistilled and ionised H_2O (10 %).

Paper is then dried and cut in transversal strips each corresponding to a determined Rf. Elution comes next for which we use — according to the test chosen — glucose or saccharose solution, described above. For calculation, corrective factors are used which enable us to consider eventual losses and avoid possible errors.

B. Auxin catabolism

1. Enzymatic extract

The method of preparation has been described elsewhere (PILET and GALSTON 1955; PILET 1957) essential datas are briefly recapitulated here:

First, the tissues are crushed in chilled (— 20 °C) mortar containing a little sand and cold buffer solution (KH_2PO_4—Na_2HPO_4: pH 6.1). The mixture is transferred for centrifugation (4000 g; 10 min.). The supernatants were decanted into 10 ml volumetric flasks and made up to 10 ml with buffer solution. At the time 0, we used 4 ml of the preceding mixture to which we added 2 ml of cold water, 2 ml of buffer solution and 2 ml of IAA (50 μg/ml).

2. Colorimetric analyses

After an incubation in a metabolic shaking incubator thermostated at 30 °C destroyed IAA is determined by taking off 2 ml of the above mixture and adding to it 8 ml of a reagent similar to the SALKOWSKI's (3 ml $FeCl_3 \cdot 6\ H_2O$ 1.5 M — 60 ml H_2SO_4 [1.84, PM: 98.08] — 100 ml H_2O). Intensity of coloration is detected with the Klett-Summerson photocolorimeter (filter of 535 mμ).

3. Expression of the results

Quantity of IAA supplied to enzymatic extract being known, as well as the one left after given incubation time, one is able to estimate destroyed IAA; this value brought back to unit of fresh weight will be the measure of IAA-oxidase activity and be established as follows: μg of IAA destroyed after 60 min. and per 200 mg of fresh weight.

III. RESULTS

A. Auxin content

1. Preliminary analyses

We will give the results of a first series of experiments carried out with following material:

a) healthy plants (H) and diseased plants (D) at the mycelium stage (Fig. 1);

b) healthy and diseased plants at the aecidiospores stage (Fig. 2).

Considering latter preliminary datas, it can be established that:

1. IAA is brought into evidence — for a Rf ranging between 0.45 and 0.60 — owing to marked inhibition of root test and effective stimulation of stem test;
2. IAA is unquestionably more abundant in infected stems than in healthy ones;
3. two accelerator systems are detected: they both stimulate, at the same time, root test and stem test, we will call them

Accelerator A_1 (Rf: 0.10 — 0.20)
Accelerator A_2 (Rf: 0.80 — 0.95)

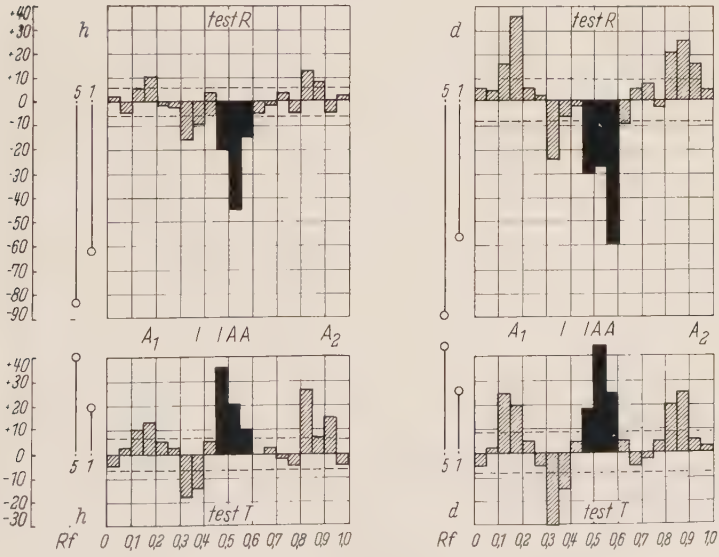

Fig. 1. Biochromatographic analyses (ether and acidic fractions) of free auxins from the stems of *Euphorbia cyparissias* infected by *Uromyces pisi* (Mycelium stage). Healthy (H): test R — 8.035 g of fresh weight, test T — 8.340 g of fresh weight. Diseased (D): test R — 7.967 g of fresh weight, test T — 8.128 g of fresh weight. % of stimulation (+) or inhibition (—) for the biological tests. Quantitative estimations: 5 and 1 μg of IAA

4. presence of an inhibitor seems positive: it causes marked reduction of elongation of root test and stem test:

Inhibitor I (Rf: 0.30 — 0.40)

Table 1

Auxins level (ether and acidic fraction of free auxins) in healthy and diseased plants of *Euphorbia cyparissias* (stem analyses). The auxin content is expressed in μg of IAA equival. per 100 g fresh weight

Caracteristics	Exp.		Stages		
			not infected	mycelium	aecidiospores
Diseased	1	A	1,07	1,94	4,12
	2		0,94	2,67	3,82
	3	B	1,26	2,40	3,59
	4		1,41	2,11	4,35
	mean values		1,17	2,28	3,97
Healthy	1	A	1,12	1,06	0,70
	2		0,87	1,31	0,67
	3	B	0,99	1,35	0,91
	4		1,18	1,22	0,48
	mean values		1,04	1,24	0,78

A: Bioassays: Test R = Root test; B: Bioassays: Test T = Stem test.

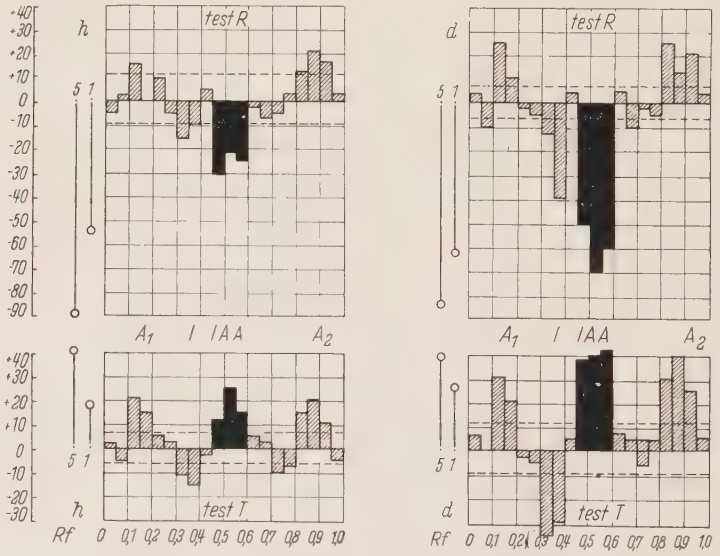

Fig. 2. Biochromatographic analyses (ether and acidic fractions) of free auxins from the stems of *Euphorbia cyparissias* infected by *Uromyces pisi* (Aecidiospores stage). Healthy (H): test R — 7.640 g of fresh weight, test T — 7.907 g of fresh weight. Diseased (D): test R — 8.410 g of fresh weight, test T — 7.912 g of fresh weight. % of stimulation (+) or inhibition (—) for the biological tests. Quantitative estimations: 5 and 1 μg of IAA

2. IAA level

Results (biochromatographic and quantitative measurements of assays dealing with auxin content variations of healthy and diseased stems will be considered as follows: (see table 1)

a) not infected
b) mycelium stage
c) aecidiospores stage
(time 0) (after 2 weeks) (after 6 weeks)

These results lead us to the following conclusions:

1. in healthy plants, the auxin content changes with time; from the not infected stage to the mycelium stage there is a slight increase of auxin concentration. From the mycelium stage to the aecidiospores stage one notes a reduction of auxin level;
2. in diseased plants the auxin concentration is constantly increasing with increasing time;
3. at each stage the auxin level is greater in diseased plants than in healthy ones (control).

In the introduction we enumerated the various analysis experiments of auxin content in infected plants; several datas of Daly and Inman (1958) will be studied again and compared with ours. As we see in table 2, the % increase of auxin content (calculated from values obtained for diseased plants compared to healthy ones), is almost the same for a similar stage. On the other hand, it should be mentioned — and this is confirmed by the two series of preceding assays — that difference is more marked between auxin content of diseased and healthy plants in aecidiospores stage.

Table 2

Auxins level in healthy (H) and diseased (D) plants of *Euphorbia cyparissias* (our datas, I) and of *Carthamus tinctorius* (datas from Daly and Inman, II).

The auxin content is expressed in μg of IAA equival. per 1000 g fresh weight

Stages	(D)		(H)		$\% = \frac{D-H}{H} \cdot 10^2$	
	I	II	I	II	I	II
Mycelium	22,8	30,0	12,4	15,0	83,8	100
Spores*)	39,7	14,0	7,8	2,1	408,9	566

*) Urediospores stages „*Carthamus tinctorius*", Aecidiospores stages „*Euphorbia cyparissias*".

As mentioned above, our first research works on infected plants of *Euphorbia* aimed at auxinic analyses of leaves (Pilet 1957). We will compare (table 3) some of the results previously published with those of this study.

Table 3

Auxins levels in healthy (H) and diseased (D) plants of *Euphorbia cyparissias.*

1. Stem (biochromatographic analyses), 2. Leaves (*Avena* curvature test, datas from PILET, 1957). Experiments with diseased plants at the aecidiospores stages. The auxin content is expressed in μg IAA equival. per 1000 g fresh weight

Organ used	(D)	(H)	D/H
Stem	39,7	7,8	5,09
Leaves*)	$91{,}5 \cdot 10^2$	$14{,}0 \cdot 10^2$	6,53

*) Only leaves from the middle portion of the stem were used.

We note, at first, the auxin content of leaves is much higher than the one of the stem. This is probably due to the following facts:

1. leaves' extracts were crude while those of stems are extracts of etheral and acid fraction of free auxins;
2. the use of two tests of different measurement, a) the *Avena* test of WENT modified (PILET 1950) which enables us to detect not only auxinic compounds but also other factors influencing growth and b) the root test (R) and the stem test (T) more specific which allow us to consider separately IAA and the other growth compounds characterized by a different Rf;
3. the stems used are practically free from mycelium and urediospores; this was not the case with the leaves invaded by fungi which contain, as is known, a valuable amount of auxins.

If we now compare the relation between the auxin values from diseased and healthy tissues, we obtain practically the same number 5.09 per 6.53. This proves that marked differences recorded are more due to technical matter than to physiological variations. We may add that if, in the case of leaves, this relation is perceptibly higher, it is likely because leaves extracts (of diseased plants) contain fungi while those proceeding from infected stems contain much less of them.

3. Accelerators and inhibitor

Comparing the relative variation of accelerators A_1 and A_2 and inhibitor I for the various stages described above (table 4 and Fig. 3) one is led to the following conclusions regarding:

a) the accelerator A_1 (Rf 0.10 — 0.20):

1 — A_1 is always more abundant in infected plants than in healthy ones, and this at the various stages of infection,

2 — the optimum concentration is to be located at the mycelium stage;

Table 4

Relative concentration for the accelerators A_1 and A_2 and for IAA

(expressed in μg IAA equival. per 100 g fresh weight; calculation from stem test) and for the inhibitor I (expressed in μg IAA equival. per 100 g fresh weight; calculations from root test)

Stages		A_1	I	IAA	A_2
		Rf 0.10—0.20	Rf 0.30—0.40	Rf 0.45—0.60	Rf 0.80—0.95
NI	H	0,25	0,41	1,04	0,50
	D	0,40	0,49	1,17	0,46
M	H	0,82	0,42	1,24	0,49
	D	1,31	1,02	2,28	1,02
A	H	0,64	0,49	0,78	0,74
	D	0,84	2,37	3,97	1,51

NI: not infected, M: mycelium, A: aecidiospores, H: healthy, D: diseased.

b) the Accelerator A_2 (Rf 0.80 — 0.95):

1 — concentration of A_2 is always more marked in diseased plants than in healthy ones,

2 — A_2 content increases constantly; it is more marked at the aecidiospores stage of infection that at the mycelium's;

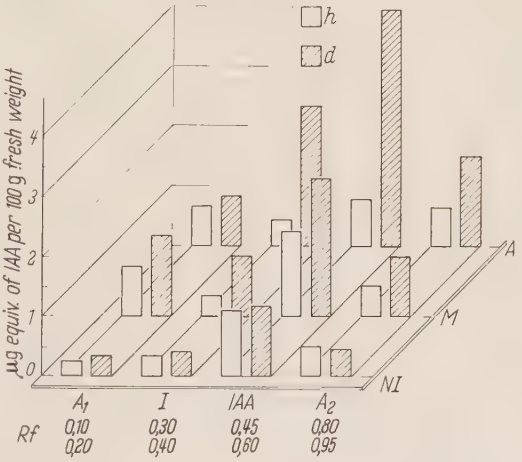

Fig. 3. Auxins level (IAA), accelerators (A_1 and A_2) and inhibitor (I) contend (expressed in terms of μg equivalents of IAA per 100 g fresh weight) in healthy (H) and diseased (D) plants (stems analyses) of *Euphorbia cyparissias* infected by *Uromyces pisi* at different stages of infection: NI: no infection (control), M: mycelium stage, A: aecidiospores stage

c) the inhibitor I (Rf 0.30 — 0.40:

1 — the infected tissues are always richer in I than healthy tissues,

2 — Concentration of I is particularly marked at the aecidiospores stage; it exceeds clearly (expressed in terms of IAA-equivalents per unit of fresh weight) those of accelerators A_1 and A_2.

B. Auxin catabolism

For each series of diseased and healthy plants (not infected, mycelium and aecidiospores stages of infection), we use various parts of stem to prepare the enzymatic extracts:

1. terminal region: between 0 and 5 cm from the apical part of the stem,
2. middle region: between 20 and 25 cm from the apical part of the stem.

Table 5

In vitro auxin destruction by enzymatic extracts from the stem of *Euphorbia cyparissias* (at different stages)
The auxin-oxidase activity is expressed in μg of IAA destroyed during 60 min. per 200 mg of fresh weight

Stages	Regions	Diseased	Healthy
not infected	T	26,1	24,2
	M	35,7	37,5
mycelium	T	8,3	26,4
	M	20,2	38,1
aecidiospores	T	4,1	29,8
	M	21,1	41,6

T: terminal part of the stem, M: middle region of the stem.

Comparing the results obtained with extracts — as above summed up — (table 5), the following conclusions can be expressed:

1. IAA-oxydases activity is constantly more marked in healthy tissues than in infected ones,
2. IAA-destruction in vitro is always less marked in apical regions of the stem, be it diseased or parasitized, than in the middle zones.

Table 6

% of inhibition of IAA destruction

Regions	Stages	D	H	$\frac{D - H}{H} \cdot 10^2$
Terminal	mycelium	8,3	26,4	– 68 %
	aecidiospores	4,1	29,8	– 86 %
Middle	mycelium	20,2	38,1	– 46 %
	aecidiospores	21,1	41,6	– 49 %

Diseased plants extracts: D — Healthy plants extracts: H

Inhibition of IAA-oxydases activity observed in infected stems, compared with healthy ones can be expressed in % (table 6). Following conclusions can be recorded:

1. inhibition of IAA-oxydase activity is more marked in apical regions than in the middle ones,
2. this inhibition is stronger at the aecidiospores stage than at the mycelium's.

Therefore (Fig. 4), the more diffusion of the fungus is marked, the more destruction in vitro (in infected tissues) of IAA is inhibited. We are obviously led to consider that the more the tissues are infected the more the auxin content increases (v. discussion p. 86—87). Let us compare the datas just discussed with some of the results previously obtained (Pilet 1954) with infected leaves of *Euphorbia.*

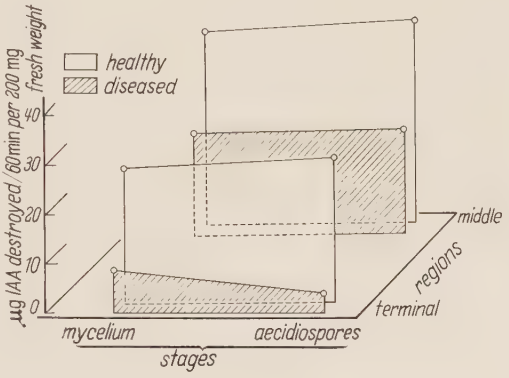

Fig. 4. In vitro auxin destruction (auxin-oxidase activity expressed in µg of IAA destroyed after an enzyme incubation of 60 min. and for 200 mg of fresh weight). The extracts were prepared from different regions (terminal and middle parts) of the stems of *Euphorbia cyparissias* infected by *Uromyces pisi* at two stages of infection (mycelium and aecidiospores stages)

Table 7

In vitro auxin destruction by leaves and stem extracts from healthy (H) and diseased (D) plants of *Euphorbia cyparissias.* Experiments with diseased plants at the aecidiospores stage. The auxin destruction is expressed in µg of IAA destroyed during 60 min. per 200 mg fresh weight

Organ used		Regions of the stem	
		Terminal	Middle
Stem	D	4,1	21,1
	H	29,8	41,6
	%	− 86 %	− 49 %
Leaves	D	15,7	12,2
	H	30,9	31,4
	%	− 48 %	− 61 %

$$\% = \frac{D - H}{H} \; 10^2$$

Examination of table 7 allows following remarks:

1. leaves and stems from infected plants disclose much less active IAA-oxydases than the same organs of healthy plants,
2. considering, however, equivalent sections, inhibition of destruction in vitro of IAA is not quite the same. This finding can be explained as follows: leaves are more numerous in apical regions than in the middle ones; it is thus easy to understand that inhibition of IAA-oxydases activity is stronger there. On the other hand, examining the urediospores' content of leaves, one notes that "density of conceptacles" is greater in leaves of the middle regions than in those of the apical regions.

These facts show and confirm our conclusions expressed in our previous publication (PILET 1957) that inhibition of IAA-oxidases is connected with parasite fungi content. It seems as if the fungus produced a compounds' system which caused inhibition of auxins destruction. We call it "anti-auxin-oxidasic system".

IV. DISCUSSION

We have seen that the presence of a parasite fungus is accompanied by:

1. considerable increase of endogenous auxin content,
2. marked reduction of auxin destruction in vitro.

Hyperauxiny of tissues, due to a parasite, now is a confirmed fact (see introduction). Nevertheless few investigations deal with fungus action on auxin catabolism of tissues infected (except for researches of PILET [1957] and SHAW and HAWKINS [1958]). Now it is proved that the

Table 8

Comparison between auxin content and auxin destruction in the stems of *Euphorbia* from healthy (H) and diseased (D) plants at the mycelium and aecidiospores stages. Auxin content (see table 2): in µg of IAA equival. per 1000 g fresh weight. Auxin destruction*) (see table 5): in µg of IAA destroyed during 60 min. per 200 g fresh weight

		Stages	
		mycelium	aecidiospores
IAA content	D	22,8	39,7
	H	12,4	7,8
	D/H	1,9	5,1
IAA destruction	D	20,2	21,1
	H	38,1	41,6
	H/D	1,8	1,9

*) Only results with extracts from middle region will be considered here because these regions were used for auxin extraction.

more abundant the fungus, the more marked the inhibition of IAA-oxidases activity. Our previous hypothesis seems correct: the parasite fungus working out an anti-auxin-oxidasic toxin.

How are related: 1. this increase of auxins' concentration, and 2. this reduction of auxins' destruction in infected tissues? In order to solve this question, see table 8 where some of the results obtained are recorded.

Considering first, the values of mycelium stage, we note that if the infected tissues contain 1.9 times more auxins than healthy tissues, there are 1.8 times more destroyed auxins in normal tissues than in diseased ones. In other terms, inhibition of auxin's destruction by fungi might well explain the hyperauxiny observed. Let us now compare the results obtained at the aecidiospores stage. Infected tissues, we note, contain 5.1 times more auxins than healthy ones, while IAA-oxidases activity is 1.9 times less. This marked hyperauxiny could not be explained by inhibition of endogenous auxins' destruction. We however know that, at this stage, fungi are very abundant; it had been proved — since the publications of THIMANN (1935), MOULTON (1942), WOLF (1952), DE GENTIL and KEIN (1955), for instance, — that fungi produce large quantities of auxins. It is thus possible to explain this hyperauxiny by intervening parallelism:

1. an important reduction of the auxin destruction of the infected tissues,
2. an active biosynthesis of auxin by the fungus; these auxins are diffused to the diseased tissues.

Growth disturbances observed (i. e. stimulation of the elongation of stems, morphological modifications of leaves, etc.) can be attributed to metabolism perturbations of auxins in infected tissues. Added to this, is the yielding of growth factors of non-auxinic nature which stimulate (accelerator A_1 and A_2) or inhibit (inhibitor I) growth of infected tissues.

In short the following scheme gives an account of observed facts:

1. it is supposed that parasite fungus would produce toxins causing inhibition of IAA-oxidases; consequently, this system would be an anti-auxin-oxidasic toxin;
2. tissues, invaded by this factor would react, causing a marked reduction of in vitro destruction of endogenous auxins;
3. IAA-oxidases activity being reduced, the total auxins content of infected tissues is going to increase;
4. this hyperauxiny, however, can be completed by an active biosynthesis of auxins through the fungus itself;
5. at last, two accelerators and one inhibitor — the presence of which in diseased tissues is proved — render this scheme intricated;
6. as auxins increase through marked reducted destruction, these accelerators and this inhibitor modify growth of infected organs.

Summary

1. Tissues (stems) of infected *Euphorbia cyparissias* by *Uromyces pisi* reveal a much larger quantity of auxins than those of healthy stems (biochromatographic analyses).

2. Enzymatic extracts from infected stems show a marked reduced IAA-oxidases activity compared to extracts obtained from non-infected stems.

3. This inhibition of i n v i t r o IAA-destruction can be explained by a relatively strong production (due to parasites fungi) of a toxin which acts as an "anti-auxin-oxidasic" factor.

4. At the mycelium stage of infection, the hyperauxiny can be simply explained in terms of the reduction of IAA-oxidases activity by the fungus.

5. At the aecidiospores stage of infection, the percentage of the increase of the endogenous auxins concentration is much greater than the percentage of the inhibition of the auxins destruction; consequently, another factor controls auxins metabolism. Now, at this stage, fungi are very abundant in diseased tissues and the auxin they synthesize should interfere. Hyperauxiny could be explained by a marked reduced destruction as well as by an increased auxin diffusion from the fungus.

6. Other processes play also a rôle: growth stimulation (accelerators A_1 and A_2) and growth reduction (inhibitor I) factors have been made evident. Action of these agents combined with changes of the auxins level and the auxins catabolism might explain the growth disturbances observed in infected tissues.

Zusammenfassung

1. Stengelgewebe von *Euphorbia cyparissias,* das mit *Uromyces pisi* infiziert ist, enthält eine viel größere Menge Auxine als gesundes Stengelgewebe (vgl. biochromatographische Analysen).

2. Enzymextrakte infizierter Stengel zeigen eine deutlich verringerte IES-Oxydasenaktivierung verglichen mit Extrakten nichtinfizierter Stengel.

3. Diese Hemmung des IES-Abbaus i n v i t r o kann durch eine relativ starke, durch den parasitischen Pilz hervorgerufene Toxinproduktion erklärt werden, die als ein „Anti-Auxin-Oxydase-Faktor" wirkt.

4. Im Myzelstadium der Infektion kann der überoptimale Auxingehalt einfach durch die vom Pilz verursachte verringerte IES-Oxydasenaktivierung erklärt werden.

5. Im Aecidiosporenstadium der Infektion ist der prozentuale Anstieg der endogenen Auxinkonzentration viel größer als die prozentuale Hemmung des Auxinabbaus; daraus folgt, daß der Auxinstoffwechsel von einem weiteren Faktor abhängt. In diesem Stadium nun ist der Pilz sehr reichlich in den kranken Geweben vorhanden, und die von ihm synthetisierten Auxine

sollten mitspielen. Überoptimaler Auxingehalt ließe sich demnach sowohl durch deutlich verringerten Abbau als auch durch gesteigerte Auxindiffusion vom Pilz her erklären.

6. Andere Vorgänge spielen ebenfalls eine Rolle: Wachstumsförderung (Acceleratoren A_1 und A_2) und Wachstumshemmung (Inhibitor I). Ihre Einwirkung in Verbindung mit schwankendem Auxinspiegel und Auxinabbau dürften die Wachstumsstörungen infizierter Gewebe erklären.

References

Allen, P. J., 1954: Physiological aspects of fungus diseases of plants. Ann. Rev. Plant. Physiol. **5**, 225.

Chevaugeon, J., 1957: Mode d'action des champignons parasites. Bull. Soc. Bot. France **104**, 56.

Daly, J. M., and R. E. Inman, 1958: Changes in auxin levels in safflower hypocotyls infected with *Puccinia carthami*. Phytopathology **48**, 91.

— —, and M. Sayre, 1957: Relations between growth and respiratory metabolism in safflower infected by *Puccinia carthami*. Phytopathology **47**, 163.

Gentile, A. C., and H. M. Klein, 1955: The apparent necessity of indoleacetic acid for the growth of *Diplodiella*. Physiol. Plant. **8**, 291.

Gruen, H. E., 1959: Auxins and fungi. Ann. Rev. Plant Physiol. **10**, 405.

Hirata, S., 1954: Studies on the phytohormone in the malformed portion of the diseased plants. Ann. Phytopathol. Soc. Japan **19**, 33.

Kern, H., 1956: Problems of incubation in plant diseases. Ann. Rev. Microbiol. **10**, 351.

Moulton, J. E., 1942: Extraction of auxin from maize, from smut tumors of maize and from *Ustilago zeae*. Bot. Gaz. **103**, 725.

— —, and G. Link, 1940: Auxin production by *Ustilago zeae*, grown on a medium free of tryptophan. Phytopathology **30**, 17.

Pilet, P. E., 1950: Nouvelle contribution à l'étude du géotropisme des étamines d'*Hosta*. Bull. Soc. bot. suisse **60**, 5.

— —, 1952: Problème hormonal concernant l'*Endophyllum sempervivi* parasite du *Sempervivum tectorum*. Bull. Soc. bot. suisse **62**, 269.

— —, 1953: Etude physiologique du parasitisme de l'*Uromyces pisi* sur l'*Euphorbia cyparissias*. Experientia **8**, 300.

— —, 1957: Dosage photocolorimètrique de l'acide β-indolyl-acétique: application à l'étude des auxines-oxydases. Rev. gén. Bot. **64**, 106.

— —, 1957: Activité anti-auxines-oxydasique de l'*Uromyces pisi*, parasite d'*Euphorbia cyparissias*. Phytopath. Z. **31**, 162.

— —, 1958: Etude chromatographique des facteurs de croissance radiculaires. C. R. Acad. Sc. (Paris) **246**, 2399.

— —, 1958: Analyse biochromatographique des auxines radiculaires: techniques et résultats Rev. gén. Bot. **65**, 605.

— —, et G. Collet, 1959: Etude de l'allongement de sections d'épicotyles (comparaison de tests auxiniques). Bull. Soc. bot. suisse **69**, 47.

— —, and A. W. Galston, 1955: Auxin destruction, peroxidase activity and peroxide genesis in the roots of *Lens*. Physiol. Plant. **8**, 888.

— —, M. Kobr et P. A. Siegenthaler, 1960: Proposition d'un test racine (*Lens*) pour dosage auxinique. Rev. gén. Bot. (Paris), in press.

Rohringer, R., 1959: Allgemeine Pflanzenpathologie. Fortschritte der Botanik, herausgegeben von E. Bünning und E. Gäumann, **XXL**, 261—384, Springer Verlag, Berlin.

Shaw, M., and A. R. Hawkins, 1958: The physiology of host-parasite relations V. A preliminary examination of the level of free endogenous indoleacetic acid in rusted and mildewed cereal leaves and their ability to decarboxylate exogenously supplied radioactive indoleacetic acid. Can. J. Bot. **36**, 1.

Thimann, K. V., 1935: On the plant growth hormone produced by *Rhizopus suinus*. J. Biol. Chem. **109**, 279.

Wolf, F. T., 1952: The production of indole-acetic acid by *Ustilago zeae* and its possible significance in tumor formation. Proc. Nat. Acad. Sc. **38**, 106.

— —, 1956: The production of indole-acetic acid by the Cedar Apple rust fungus, and its identification by paper chromatography. Phytopath. Z. **26**, 219.

Zimmermann, W. A., 1936: Untersuchungen über die räumliche und zeitliche Verteilung des Wuchsstoffes bei Bäumen. Z. f. Bot. **30**, 209.

Aus dem Institut für allgemeine Botanik der Friedrich-Schiller-Universität, Jena

Direktor: Prof. Dr. Hans Wartenberg

Studien zur fungiziden Wirkungsweise der Kupfer-Kalzium-Verbindungen

Von

R. Tröger

Mit 2 Abbildungen

Das wirksamste Fungizid auf Kupfer-Kalk-Basis ist bekanntlich die Bordeaux-Brühe, über deren Herstellung und Anwendung heute eine so umfangreiche Literatur existiert, daß es sinnlos wäre, einzelne Arbeiten zu zitieren. In letzter Zeit wurde versucht, die Bordeaux-Brühe durch organische Fungizide (Chloranil, Phygon und Thiocarbamate) zu ersetzen, um das teure Kupfer einzusparen. Versuche haben aber gezeigt, daß in Ländern mit feuchtem Klima die Bordeaux-Brühe nicht durch die zur Zeit bekannten organischen Fungizide zu ersetzen ist, da die organischen Substanzen kein ausreichendes Haftvermögen auf den bespritzten oder bestäubten Pflanzenteilen haben. Deshalb werden auch heute noch beträchtliche Mengen Cu für den Pflanzenschutz verbraucht. Frear (1949) nennt für Amerika 80 Millionen pounds Kupfersulfat im Jahre, und McCallan (1957) schätzt den Jahresverbrauch auf 60 Millionen pounds.

Seit der zufälligen Entdeckung der fungiziden Wirkung der Kupferkalk-Brühe durch Winzer der Stadt Bordeaux in der Mitte des 19. Jahrhunderts und seit der ersten Abhandlung, die Millardet und Gayon (1887) darüber geschrieben haben, war man bis heute bemüht, etwas über das wirksame Prinzip dieser Spritzbrühe zu erfahren. Die ersten Angaben zum Chemismus der Brühe stammen von Millardet. Allgemein wurde angenommen, daß das Kupferhydroxyd das wirksame Prinzip der basischen Kupfer-Kalzium-Verbindungen sei. Pickering (1907) hat als erster mit dieser Anschauung gebrochen. Nach seiner Ansicht sollen, je nach Mischungsverhältnis, aber abhängig von der Menge des Kalkes, eine Reihe verschieden zusammengesetzter, basischer Kupfersulfate und basischer Kupfer-Kalziumsulfate, z. B. 10 $CuO \cdot SO_3 \cdot 4\ CaO \cdot SO_3$, entstehen. Pickerings Anschauung blieb lange Zeit im Prinzip unwidersprochen, wenn davon abgesehen wird, daß gewisse Ab-

änderungen der veröffentlichten Formeln lediglich in der Zusammensetzung des Niederschlages der stärker alkalischen Brühen vorgeschlagen wurden.

Nach WÖBER (1919) sollen andere Zusammensetzungen des Bordeaux-Brühe-Niederschlages entstehen:

Wenig Kalziumhydroxyd und Kupfersulfat:

I $(CuSO_4 \cdot 3\ Cu(OH)_2 \cdot x\ H_2O)$

Bei vergrößerter Menge von Kalziumhydroxyd:

II $(CuSO_4 \cdot 4\ Cu(OH)_2 \cdot x\ H_2O)$

Weitere Kalziumhydroxydzugabe führt zu:

III_1 $(CuSO_4 \cdot 4\ Cu(OH)_2 \cdot 1\ Ca(OH)_2 \cdot x\ H_2O)$

WÖBER führte aus, daß das in dieser Formel erscheinende Kalizumhydroxyd lediglich an die Verbindung der Formel II angelagert sei. Bei verstärkter Kalizumhydroxyd-Beimischung würde dann folgende Verbindung entstehen:

III_2 $(CuSO_4 \cdot 4\ Cu(OH)_2 \cdot 3\ Ca(OH)_2 \cdot x\ H_2O)$.

Wenn dieser Komplex zustande gekommen wäre, würde weiter zugefügtes Kalziumhydroxyd nur den Bodenkörper vom Kalziumhydroxyd vermehren. Formelmäßig ließe sich dies folgendermaßen darstellen:

III_3 $(CuSO_4 \cdot 4\ Cu(OH)_2 \cdot 3\ Ca(OH)_2 \cdot x\ H_2O + x\ Ca(OH)_2$

Diese Brühen (III_3) könnten im Pflanzenschutz jedoch nicht verwendet werden, weil sie die bespritzten Blätter verbrennen würden.

MARTIN (1932) hat nochmals den Chemismus der Bordeaux-Brühe bearbeitet und kam zu etwas anderen Ergebnissen als PICKERING; die WÖBERschen Anschauungen wurden dabei nur wenig abgewandelt. Nach MARTIN bildet sich bei dem Mischen der Komponenten der Bordeaux-Brühe je nach dem Mengenverhältnis, abhängig vom Kalziumhydroxyd oder Kalziumoxyd, folgender Niederschlag:

$[Cu(OH)_2]_3 \cdot CuSO_4$ [bei 1 : 0,75 $CuSO_4$ zu $Ca(OH)_2$].

Bei diesem Mischungsverhältnis hätte alles Kupfersulfat mit dem Kalziumhydroxyd reagiert, und weiteres Zusetzen von Kalziumhydroxyd bewirke ein Zerlegen des gebildeten Niederschlages der obigen Formel. Das Sulfation soll dabei aus dem Verband herausgesprengt werden, wobei blaugefärbte hydratisierte Kupferoxyde entstünden, die aber durch das adsorbierte Kalziumsulfat stabilisiert würden. MARTIN hat bei seinen Untersuchungen gerade diese Tatsache ausführlich untersucht und beschrieben.

Drei Ansichten haben sich also über die Zusammensetzung des Bordeaux-Brühe-Niederschlages herausgebildet, wovon zwei bis jetzt teilweise unwidersprochen blieben. Leider wurden zu den äußerst wichtigen Problemen des chemischen Aufbaues des Niederschlages von den Chemikern keine weiteren Arbeiten veröffentlicht.

Für die Pflanzenschutzpraxis ist es von ausschlaggebender Bedeutung, daß frisch hergestellte Bordeaux-Brühe gespritzt wird, daß also nicht schon im Ansatz ein Altern einsetzt. Nach Angaben von Butler (1914) ist es unbedingt nötig, daß die günstigsten Mischungsverhältnisse (1 : 0,75 — 0,80, $CuSO_4$: CaO) genau eingehalten werden, da es sonst zu Kristallisationserscheinungen des gelartigen Niederschlages in der Brühe kommt,was die Haftfähigkeit der Spritzpartikeln auf den Pflanzenorganen maßgeblich negativ beeinflußt. Ein zu großer Überschuß an Kalziumhydroxyd führe immer zu Kristallisationserscheinungen des Sedimentes. Burchfield und Goenaga (1957) untersuchten die Haftfähigkeit gealterter Brühen und stellten fest, daß sich Sphaerokristalle in der Brühe bilden. Das Wachstum dieser Kristalle könnte maßgeblich durch Zugabe von Zucker (Sucrose) und Lignosulfoat beeinflußt werden, indem diese Stoffe die Kristallbildung unterdrückten. Durch diese Maßnahmen sei es dem Praktiker möglich, auch gealterte Brühen als wirkungsvolles Spritzmittel im Pflanzenschutz einzusetzen. Mit der Zugabe von Netzmitteln (surfactants) könnte diese Maßnahme noch unterstützt werden. Auf bestimmten Pflanzenorganen sei dies jedoch überflüssig, lediglich bei stark wachshaltigen Blattoberflächen sei der Einsatz von Netzmitteln geboten, um ein Ausspreiten der Spritztropfen und damit eine gute Oberflächenverteilung des Pflanzenschutzmittels zu erzielen.

Auf den Chemismus der anderen basischen Cu-Spritzmittel soll hier nicht näher eingegangen werden, da sich die vorliegende Abhandlung nur auf die kalziumhaltigen Mittel beschränken soll. Nach den Angaben von Martin ist somit in der Bordeaux-Brühe ein basisches Kupfersulfat vorhanden, was zwar hochdispers aber im Suspensionsmittel wenig löslich ist.

Neben diesen drei Arbeiten, die den Chemismus der Bordeaux-Brühe behandelten, gibt es eine Vielzahl von Schriften, die sich mit der fungiziden Wirkung der Bordeaux-Brühe auseinandersetzen.

Folgende Tatsachen seien vorweggenommen: In frisch nach den Vorschriften zubereiteten Bordeaux-Brühen, in denen alles Kupfersulfat mit dem Kalziumhydroxyd reagiert und der stabilisierende Einfluß der Sulfationen bzw. des Kalziumhydroxyds eingesetzt hat, kann mit den herkömmlichen mikrochemischen Methoden k e i n freies Kupfer im Suspensionsmittel nachgewiesen werden. Mikroanalytisch werden für diese Untersuchungen allgemein Indikatoren verwendet, die noch auf 0,3 γ Cu/ml ansprechen (Diphenylcarbazon, Diphenylcarbazid, Natriumdiäthyldithiocarbamat bzw. Dithizon). In gealterten Brühen (24 Std.) können Werte um 0,2 bis 0,3 γ Cu/ml ermittelt werden, wenn sich die Brühen noch im Ansatzgefäß befinden. Wird die Bordeaux-Brühe jedoch gespritzt, es ist dabei ganz gleich, ob auf Glas (Laborprüfung) oder auf Pflanzenorgane, so ist nach dem Austrocknen des Spritzbelages, bei Zugabe von Wasser zum Belag, Kupfer in der ablaufenden Flüssigkeit nachweisbar. Wilcoxon und McCallan (1938), denen wir sehr genaue Untersuchungen über die Wettereinflüsse bezüglich basischer Spritzbeläge verdanken, geben 0,45 mg Kupfer je 225 cm^2 Spritzbelag einer eingetrockneten 2%igen Bordeaux-Brühe an. Dies entspricht etwa einer 4 : 4 : 50-Brühe. Die Autoren sind der Meinung, daß die Menge abgeschwemmten

Kupfers wohl ausreiche, Pilzsporen zu schädigen. Auf die Versuche von WILCOXON und MCCALLAN wurde deshalb hingewiesen, weil die meisten Hypothesen zur Erklärung der fungiziden Eigenschaften von Bordeaux-Spritzbelägen von der Meinung ausgehen, daß ausschließlich das „freie", also das ungebundene Kupfer, ein Vergiften der Pilzsporen bewirkt. Immer wurde nach den Prinzipien des Herauslösens des fungizid wirkenden Kupfers aus Belägen gesucht.

Das Lösen von Spritzniederschlägen der Bordeaux-Brühe hat RECKENDORFER (1936) bearbeitet. Er veröffentlichte folgende Formeln, die den Vorgang des Lösens erklären sollen. Bezüglich des chemischen Aufbaues von Bordeaux-Brühe-Sedimenten sollen die Formeln WÖBERS gelten und das Fungizid auf dem bespritzten Blatt als

$$III_1\ CuSO_4 \cdot 4\ Cu(OH)_2 \cdot 1\ Ca(OH)_2$$

haften. Unter dem Einfluß der Luftkohlensäure käme es nun im Belag, wenn Wasser zugegen wäre, zu Umwandlungen. Das Wasser könnte dabei in Form von wasserdampfgesättigter Luft, Tau oder Regen einwirken.

$$III_1\ CuSO_4 \cdot 4\ Cu(OH)_2 \cdot 1\ Ca(OH)_2 + CO_2 + H_2O$$

soll sich in:

$$CuSO_4 \cdot 4\ Cu(OH)_2 \cdot 1\ CaCO_3 \text{ verwandeln.}$$

Nochmaliger Einbau von $CO_2 + H_2O$ müsse

$$CuSO_4 \cdot 4\ CuCO_3 \cdot 1\ CaCO_3$$

ergeben. Bei weiterem Zutritt von CO_2 und H_2O sollen sich dann nachfolgende Verbindungen herausbilden:

$$CuSO_4 + Cu(HCO_3)_2 + Ca(HCO_3)_2.$$

Schließlich läge also freies Kupfersulfat, Kupferhydrogenkarbonat und Kalziumhydrogenkarbonat auf dem Blatt vor, wobei beide Kupferverbindungen löslich seien und für die fungizide Wirkung zur Verfügung ständen. Würde durch erneutes Austrocknen des Belages die Kohlensäure verdrängt, so müßte sich das Kupferhydrogenkarbonat in unlösliches Kupferkarbonat zurückverwandeln, was dann bei erneuter Wasserzugabe und Kohlensäureeinfluß wieder zu Kupferhydrogenkarbonat werden könne. Durch diese Verwandlungsfähigkeit des Kupferkarbonates würde also nur schubweise lösliches Kupfer frei und die Pflanze durch diese Mengen nicht geschädigt, obwohl Pilzsporen getötet, zumindest aber am Auskeimen gehindert werden könnten.

Alle Untersuchungen, die angestellt wurden, um nachzuweisen, daß die Umsetzungen der Bordeaux-Brühe mit der Atmosphäre giftiges Kupfer freisetzen, waren praktische Beweise für die Theorie von NÄGELI (1893), die das „oligodynamische Wirken" der Metallspuren zu erklären versuchte.

Diese Theorie wurde zur Erklärung der fungiziden Kupferwirkung aufgegriffen (BARTH 1894, SWINGLE 1896, WORTMANN 1919, KILLING 1920), denn sie gab eine plausible Erklärung für die fungizide Wirkung der Bordeaux-Brühe-Niederschläge. Neben der CO_2-Theorie der Bordeaux-Brühe-Zersetzung kamen noch andere Meinungen auf. BARTH schrieb 1894, daß die

Ausscheidungen der Blätter den Spritzbelag auflösen würden. Wortmann (1919) und Killing (1920) meinten, eine „negative Strahlung" des Spritzbelages töte die Pilzsporen. Swingle (1896) behauptete dann noch, die Pilzsporen selbst würden Stoffe abgeben, die das Kupfer aus dem Spritzbelag herauszulösen vermögen (Selbstmordtheorie).

Alle diese Hypothesen wurden in den weiteren Jahrzehnten durch zahlreiche Arbeiten gestützt oder widerlegt (Zusammenfassende Darstellung bei Horsfall 1956). Sie befassen sich alle — abgesehen von der „Strahlungsthese" — mit dem Löslichwerden des Cu der Bordeaux-Brühe.

Eingangs wurde schon darauf hingewiesen, daß im Suspensionsmittel frisch zubereiteter Bordeaux-Brühe mikroanalytisch kein „freies" Kupfer nachgewiesen werden kann. Es ist deshalb eigenartig, daß die Bordeaux-Brühe gleich nach dem Mischen ausgezeichnet fungizid wirkt, was auch schon Clark (1902), Crandall (1909), Barker und Gimmingham (1911), Lutmann (1912) und McCallan (1930) beschrieben haben.

Diese Tatsache war vielleicht auch der Anlaß dafür, daß Villedieu und Villedieu (1924) sowie Chaine (1929) aussagten, die unlöslichen $Cu(OH)_2$-Partikeln hätten bereits eine Giftwirkung, weil sie als Oxydationskatalysatoren wirken würden; durch den katalytischen Effekt könnten die Pilzsporen, wenn nicht getötet, so doch am Auskeimen gehindert werden.

Mit der Katalysehypothese konnten sich die Fungizidforscher nicht recht anfreunden — es wird in der Literatur nicht wieder darauf bezug genommen —, obwohl eindeutig nachzuweisen ist, daß z. B. die Partikeln der Bordeaux-Brühe stark oxydierende Eigenschaften haben (Tröger 1956).

Die Untersuchungen nach Villedieu und Villedieu sowie Chaine befaßten sich immer wieder mit dem Herauslösen von wirksamem Kupfer aus den Spritzpartikeln. Weil aber nicht zu übersehen war, daß die Partikeln der Brühe sofort nach dem Entstehen toxisch wirken, fühlten sich z. B. Goldsworthy und Green (1936) dann veranlaßt, ein „available copper in the residues" zu postulieren, das von den Sporen aufgenommen werden könnte, ohne daß sich der Spritzniederschlag aufzulösen brauche.

Goldsworthy und Green kamen zu dieser Auslegung durch umfassende Versuche, bei denen mit Hilfe eines Kupferkomplexbildners — meines Wissens das erste Mal — Kupfer in kupferbehandelten Sporen nachgewiesen wurde. Die Autoren konnten feststellen, daß sich in den Sporen, die auf Spritzniederschlägen klebten, Kupfer befand, da die Sporen rot gefärbt waren, als der Indikator zugegeben wurde. Nach der Reagenzzugabe waren aber auch die Bordeaux-Brühe-Partikeln rot gefärbt. Nach Meinung der Autoren müsse also ein „verfügbares" Kupfer im Spritzbelag vorhanden sein, das in die Sporen einzudringen vermöge. Will man entscheiden, ob die Villedieusche Kontakthypothese oder die Thesen, die dem in die Zelle eingedrungenen Cu die Giftigkeit zuschreiben, richtig sind, muß geprüft werden, was unter dem „available copper" von Goldsworthy und Green zu verstehen ist.

Um einer Lösung der Rätsel näher zu kommen, mußte untersucht werden, welchen Einfluß das Ca auf die Cu-Aufnahme und den Nachweis des

Metalles in den kupfervergifteten Konidien ausübt und welche Menge Wasser überhaupt zum Spritzniederschlag zugefügt werden muß, damit auf dem Niederschlag liegende Konidien getötet werden.

Material und Methode

Als Versuchspilz wurde *Fusarium decemcellulare* (Brick) verwendet. Die Anzuchtmethoden des Pilzes und die Gewinnung der Konidien sind in früheren Mitteilungen beschrieben worden (TRÖGER 1956, 1960).

Als Mikroreagenzien für Kupferbestimmungen kamen Diphenylcarbazon bzw. Na-diäthyldithiocarbamat zur Anwendung.

Alle Glasgeräte sind mit HCl und H_2O dest. gereinigt worden und bestanden aus Jenaer Geräte-Glas 20. Die Chemikalien hatten den handelsüblich höchsten Reinheitsgrad und stammten von der Laborchemie Apolda bzw. Berlin oder von Merck.

Die cH^+ wurde mit Indikalpapier gemessen.

Das Wasser ist in einer Schott-Apparatur destilliert worden, die aus Rasotherm bzw. Geräteglas 20 bestand.

Als Bordeauxbrühe kam ein 4 : 4 : 50-Ansatz zur Verwendung, oder es wurde eine Spritzbrühe hergestellt, die im Milliliter 20 γ Cu hatte und deren cH^+ nach dem Mischen bei pH 7,8 gemessen wurde.

Die photographischen Aufnahmen wurden mit der Contax D hergestellt. Film: Agfa Isopan FF. Objektiv: Apochromat 60×. Okular: Kompensationsokular 20×.

Versuchsergebnisse

A. Die Wirkung des Ca auf die Cu-Aufnahme und den Cu-Nachweis in Konidien von *Fusarium decemcellulare*

In einer früheren Mitteilung (TRÖGER 1960) war berichtet worden, daß die Konidien des Versuchspilzes innerhalb kürzester Zeit bestimmte Mengen Metall aus $CuSO_4$-haltigen Lösungen aufnehmen. Dieses Metall ist aber erst 2 bis 3 Stunden nach dem Einwirken mittels komplexchemischer Reaktion in der Konidie nachweisbar. Schwefel, oberflächenaktive Substanzen und Hitze können die Konidiensubstanz aber soweit verändern, daß dann das aufgenommene Metall sofort mit den Indikatoren reagiert.

In den nun abzuhandelnden Versuchen ist das Wirken des Ca auf die metallbehandelte Konidie geprüft worden.

Für den Versuch sind Konidien den 10 Tage alten Anzuchten entnommen, gewaschen und in Aqua dest. resuspendiert worden. Die eingestellte Suspension hatte $1 \cdot 10^5$ Konidien/ml. Ein Teil der Suspension bildete die Kontrolle, d. h. die Konidien wurden nicht mit Kalzium behandelt, lediglich 3 γ Cu/ml (als Sulfat) waren in diesen Anteil der Suspension einpipettiert worden (Tab. 1). Die nachfolgende Aufstellung gibt uns Auskunft über den Nachweis des Kupfers in den Konidien bei Verwendung von Diphenylcarbazon als Indikator.

Tabelle 1

Der Nachweis des Kupfers in *Fusarium*-Konidien,
(Kontrolle zu Tabellen 2, 3 und 4)

Nachweis des Kupfers nach Stunden	Konidien: $1 \cdot 10^5$/ml	Kupfer: 3 γ/ml	Indikator: Diphenylcarbazon
1	keine positive Kupferreaktion		
2	0,8 % aller Konidien hatten eine oder mehrere Kammern mit positiver Cu-Reaktion		
3	12 % aller Konidien hatten eine oder mehrere Kammern mit positiver Cu-Reaktion		
4	29 % aller Konidien hatten eine oder mehrere Kammern mit positiver Cu-Reaktion		

Tabelle 2

Der Nachweis des Kupfers in *Fusarium*-Konidien,
wenn gleichzeitig mit dem Kupfer eine kleine Menge $Ca(OH)_2$ gegeben wurde.
Die cH^+ des Ansatzes war pH 6,0

Nachweis des Kupfers nach Stunden	Konidien: $1 \cdot 10^5$/ml	Kupfer: 3 γ/ml	$Ca(OH)_2$ pH 6,0	Indikator: Diphenylcarbazon
1	keine positive Kupferreaktion			
2	0,8 % aller Konidien hatten eine oder mehrere Kammern mit positiver Cu-Reaktion			
3	48 % aller Konidien hatten eine oder mehrere Kammern mit positiver Cu-Reaktion			
4	68 % aller Konidien hatten eine oder mehrere Kammern mit positiver Cu-Reaktion			

Tabelle 3

Der Nachweis des Kupfers in *Fusarium*-Konidien,
wenn gleichzeitig mit dem Kupfer eine kleine Menge $Ca(OH)_2$ gegeben wurde.
Die cH^+ des Ansatzes betrug pH 6,9

Nachweis des Kupfers nach Stunden	Konidien: $1 \cdot 10^5$/ml	Kupfer: 3 γ/ml	$Ca(OH)_2$ pH 6,9	Indikator: Diphenylcarbazon
1	0,9 % aller Konidien hatten eine oder mehrere Kammern mit positiver Cu-Reaktion			
2	8 % aller Konidien hatten eine oder mehrere Kammern mit positiver Cu-Reaktion			
3	70 % aller Konidien hatten eine oder mehrere Kammern mit positiver Cu-Reaktion			
4	91 % aller Konidien hatten eine oder mehrere Kammern mit positiver Cu-Reaktion			

Die anderen Anteile der Suspension bekamen geringe Mengen Kalziumhydroxyd und 3 γ Cu/ml zugesetzt, wobei mit der Kalziumhydroxydmenge die cH^+ der Suspension variiert wurde. Aus den Aufstellungen sind die Resultate der Versuche zu ersehen.

Während also die Konidien der Kontrolle (Tab. 1) nur mit Kupfer behandelt wurden, beziehen sich die Werte der Tabellen 2, 3 und 4 auf die Wirkung des Kupfers zuzüglich Kalzium.

Tabelle 4

Der Nachweis des Kupfers in *Fusarium*-Konidien, wenn gleichzeitig mit dem Kupfer eine kleine Menge $Ca(OH)_2$ gegeben wurde. Die cH^+ des Ansatzes betrug pH 7,9

Nachweis des Kupfers nach Stunden	Konidien: $1 \cdot 10^5$/ml	Kupfer: 3 γ/ml	$Ca(OH)_2$ pH 7,9	Indikator: Diphenylcarbazon
1	keine positive Kupferreaktion			
2	1 % aller Konidien hatten eine oder mehrere Kammern mit positiver Cu-Reaktion			
3	18 % aller Konidien hatten eine oder mehrere Kammern mit positiver Cu-Reaktion			
4	36 % aller Konidien hatten eine oder mehrere Kammern mit positiver Cu-Reaktion			

Tabelle 5

Nachweis des Kupfers in metallbehandelten Konidien von *Fusarium decemcellulare*, die unter Kalziumchlorideinfluß standen

Nachweis des Kupfers nach Stunden	Konidien: $1 \cdot 10^5$/ml		Kupfer: 3 γ/ml	Indikator: Diphenylcarbazon	
	$CaCl_2$				
	10^{-2} m	10^{-3} m	10^{-4} m	10^{-5} m	10^{-6} m
1	0,4 % Cu+	0,3 % Cu +	0,1 % Cu+	32 % Cu+	19 % Cu+
2	16 % Cu+	2,2 % Cu+	0,9 % Cu+	62 % Cu+	50 % Cu+
3	26 % Cu+	42 % Cu+	53 % Cu+	71 % Cu+	62 % Cu+

Werden die Werte der Tabellen 1 und 3 verglichen, so sieht man, daß in den Konidien, die mit Kalziumhydroxyd behandelt worden waren, viel eher Kupfer nachweisbar ist als in den Konidien, die zwar die gleiche Menge Kupfer, aber kein Kalziumhydroxyd bekommen hatten. Kalziumhydroxyd scheint also in geringen Konzentrationen ähnlich wie Schwefel zu wirken. Bei einer größeren Kalziummenge war dann wieder der gegenteilige Effekt zu bemerken. Die Kalziumwirkung ist also eine Optimumsfunktion. Bei dem beschriebenen Versuch konnte aber die Vermutung aufkommen, daß der Nachweis des Kupfers mittels Diphenylcarbazon nicht lediglich Ca-abhängig ist,

da ja nicht nur das Kalziumion in die Suspension eingebracht, sondern gleichzeitig auch die cH^+ geändert worden war. Zugesetztes Kalziumhydroxyd in Mengen, bei denen in der Suspension alkalische Reaktion erreicht wurde, konnte möglicherweise das Kupfer als unlösliches Metall festlegen, wodurch der schlechte Nachweis des Kupfers im alkalischen Bereich gegeben war.

In einer weiteren Versuchsreihe sind nun die cH^+-Änderungen ausgeschaltet worden, indem nicht Kalziumhydroxyd, sondern Kalziumchlorid zu den Konidien derselben Suspension gegeben wurde. Die nachfolgende Tabelle enthält Ergebnisse dieses Versuches.

Aus Tabelle 5 ist zu ersehen, daß das Ca-Ion einen maßgeblichen Einfluß auf die *Nachweisbarkeit* des Cu in den Konidien des Versuchspilzes ausübt. Beachtenswert ist, daß von kleinen Mengen Ca dabei die stärkste Wirkung ausging. Da 10^{-5} m Ca-Ionen am wirksamsten waren, das Beeinflussen des Cu-Nachweises bei den Konidien des Pilzes also eine Optimum-Funktion darstellt, ist damit zu rechnen, daß ein Reaktionsablauf der Zellsubstanz in seiner Intensität von bestimmter Ca-Sättigung abhängig ist.

Für alle Versuche, die mittels Kalziumionen durchgeführt wurden, soll ausgesagt werden, daß Diphenylcarbazon mit Kalziumionen keine Reaktion eingeht. Lediglich unphysiologische Kalziumhydroxydmengen, die eine Alkalität um pH 12 bewirken, schränken die Verwendung des Diphenylcarbazons als Indikator ein, da durch die starke Alkalität der Indikator unter Rotfärbung zersetzt wird. Das Zerstören ist nur cH^+-abhängig. Es ist dabei gleichgültig, ob Natrium-, Kalzium-, Kalium- oder Ammoniumhydroxyd die Alkalität bewirken.

B. Die Konidien des Versuchspilzes auf Bordeauxbrühe-Niederschlägen

Neben den besonderen Verhältnissen des Cu-Speicherns bei Konidien von *Fusarium decemcellulare*, die sich in Bordeaux-Brühe befanden, die also im Suspensionsmittel der Cu-Ca-Teilchen gleichfalls suspendiert waren, sollte nun noch das Verhalten der Konidien auf eingetrockneten Spritzbelägen untersucht werden.

Das Verhalten der Konidien in der Bordeaux-Brühe gibt zwar Anhaltspunkte über das toxische Wirken des Fungizids, die aber nicht unmittelbar für die Belange der Pflanzenschutzpraxis übernommen werden dürfen. Hier wird das Fungizid gespritzt, d. h. ein dünner Film eingetrockneter Bordeaux-Brühe haftet mehr oder weniger auf den Pflanzenorganen und muß die Pflanze gegen Krankheitserreger schützen. Die Theorien des Herauslösens von „freiem", toxisch wirkendem Kupfer wurden schon abgehandelt. Nicht bearbeitet sind aber meines Wissens die Verhältnisse der Kupferaufnahme durch Konidien, wenn sie nur eine kurze Zeit auf den trockenen Bordeaux-Brühe-Spritzbelägen liegen. Weiterhin ist nicht geklärt, welche Menge Wasser zum eingetrockneten Spritzbelag kommen muß, damit eine toxische Wirkung auf die Konidien eines Pilzes ausgeübt wird. Wilcoxon und McCallan (1938) hatten in ihren Versuchen lediglich das Regenwasser, das von den mit Fungizid bespritzten Glasplatten ablief, auf Kupfer untersucht. Sie haben aber nicht

die Verhältnisse analysiert, denen die Konidien ausgesetzt sind, wenn sie auf die Fungizidplatten fallen, also angeweht oder aufgeschmiert werden.

Die Versuchsergebnisse von GOLDSWORTHY und GREEN (1936) sind schon in der Einleitung besprochen worden. Diese Ergebnisse sollen nun nochmals überprüft werden. Auch die Theorie von LOWRY, SUSSMAN und BÖVENTER (1957) wird, auf *Fusarium*-Sporen übertragen, einer Prüfung unterzogen. Diese drei Autoren arbeiteten mit Ascosporen von *Neurospora tetrasperma* und stellten fest, daß die ruhenden Sporen Kupfer und Silber adsorbierten, daß das Eindringen der Metalle in die Sporen und damit eine Keimhinderung aber erst erfolgen soll, wenn die Sporen in Wasser suspendiert würden. Die ruhende Spore wäre somit impermeabel für Kationen. Die Permeabilitätsbarriere würde erst dann aufgehoben, wenn eine Keimung der Spore induziert würde.

Für die Versuche ist eine 4 : 4 : 50-Bordeaux-Brühe gemischt worden, die sofort mittels Zerstäubers auf gesäuberte Glasplatten gesprüht wurde. Der trockene Belag auf dem Glase war so dicht, daß keine unbesprühten Glasflächen vorhanden waren. Die Glastafeln mit dem eingetrockneten Belag standen bei Zimmertemperatur ungefähr 5 Stunden. Nach Ablauf dieser Zeitspanne sind mit einem Porzellanspatel Konidien den Anzuchten entnommen und in dünner Schicht auf die Glasplatten aufgestrichen worden. Die Konidien kamen also nicht mit Wasser in Berührung, sie konnten somit keine Keiminduktion erhalten haben. Weiterhin wurden Konidien für diesen Versuch verwendet, die aus 30 Tage alten Anzuchten stammten. Nach der Kulturdauer befindet sich kein Kondenswasser mehr auf dem Agar oder an den Sporodochien.

Fünf Stunden nach dem Aufstreichen der Konidien auf die mit Bordeaux-Brühe-Niederschlag behafteten Glasplatten ist vorsichtig ein Tropfen Diphenylcarbazonlösung auf die Konidien gegeben worden. Um die Gefahr zu umgehen, daß sich der vom Indikator mit den Spritzpartikeln gebildete Kupferkomplex an den Konidien niederschlägt, wurde die mit dem Indikator versetzte Glasplatte nicht bewegt. Die Platten sind deshalb vor der Reaktion auf den Tisch des Mikroskops gelegt worden. Von den Konidien adsorbierter Kupferkomplex hätte dabei auch nur die Ergebnisse der Kupferadsorption verfälscht. In meinen Versuchen sollten die Konidien aber hauptsächlich bezüglich ihres aufgenommenen Kupfers untersucht werden. In Vorversuchen war festgestellt worden, daß der Diphenylcarbazon-Kupfer-Komplex nicht in die Konidien von *Fusarium decemcellulare* einzudringen vermag, trotzdem ist aber schon 20 Sekunden nach dem Auftropfen des Indikators mit der mikroskopischen Untersuchung begonnen worden.

Die Ergebnisse, die aus den Versuchsansätzen resultierten, waren überraschend. Von den Konidien, die 5 Stunden auf dem Spritzbelag gelegen hatten, ohne daß während dieser Zeit Wasser einwirkte, reagierten 78 % nach Zugabe des Indikators kupferpositiv. Bei den durchmusterten Sporen waren oft nicht sämtliche Konidienkammern kupferhaltig, doch ist deutlich beobachtet worden, daß Konidien, die auf den Spritzpartikeln lagen oder mit Spritzpartikeln verklebt waren, mehr Kupfer aufgenommen hatten, als Ko-

nidien, die sich in der zweiten oder dritten Schicht über den Spritzbelägen befanden. Hier konnten viele Konidien gefunden werden, die überhaupt noch keine positive Kupferreaktion zeigten. In weiteren Versuchsreihen wurde zwar versucht, die Konidien möglichst dünn auf den Belag auszustreichen, um vielleicht beweisen zu können, daß nur diejenigen Konidien Kupfer aufnehmen, die unmittelbar an der Belagpartikel haften, Solche dünnen Filme, bei denen praktisch eine Konidienschicht auf den Partikeln lag, die nur die Dicke der Konidien hatte, konnten aber experimentell nicht erzeugt werden. Es lassen jedoch die Ergebnisse mit dünnen Filmen den Schluß zu, daß nur diejenigen Konidien von trockenen Belägen Kupfer aufnehmen, die direkt auf den Belagteilchen hafteten, wenn der Versuch so angesetzt war, daß auf die Konidien kein Wasser einwirkte.

Für die Konidien des Pilzes *Fusarium decemcellulare* ist somit die Theorie von Lowry, Sussman und Böventer nicht zutreffend. Ruhende Konidien sind, ohne daß sie im Wasser suspendiert werden, in der Lage, selbst aus schwerlöslichen trockenen Kupferpräparaten Metall aufzunehmen.

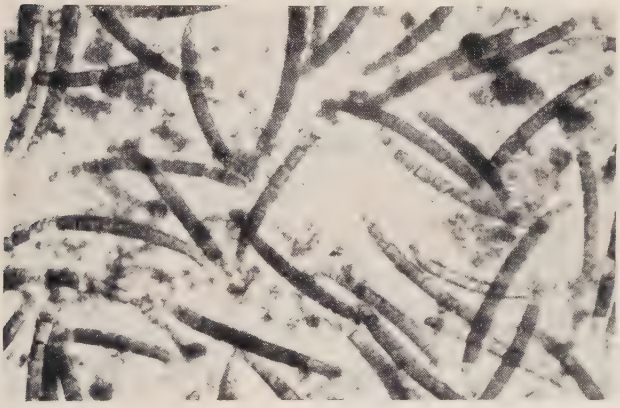

Abb. 1. Konidien von *Fusarium decemcellulare* und Spritzmittelpartikeln auf einer Glasplatte bei Zugabe von Diphenylcarbazonlösung. Einwirkungszeit des Fungizids: 4 Stunden. Einwirkungszeit des Indikators: 30 Sekunden. Vergrößerung: 450×

Die Zeiten, während derer die Konidien auf den Belägen klebten, waren relativ kurz, und es galt nun, durch weitere Versuche festzustellen, nach welcher Zeit in den auf Spritzbelag aufgestrichenen Konidien das Metall mit Hilfe von Komplexbildnern sichtbar wird. Die Versuche wurden nach der oben beschriebenen Methode durchgeführt. Auf die Glasplatten ist der Kupferindikator gegeben worden, als sich die Konidien erst eine bzw. fünf min auf dem Spritzbelag befanden; und die mikroskopische Kontrolle begann sofort nach Indikatorzugabe. Bei dem Versuch kam folgendes Ergebnis zustande: In 5,2 % Konidien, die nur eine Minute auf den Spritzpartikeln klebten, war schon Kupfer nachzuweisen. Bei 5 Minuten Kupfereinwirkung konnten bereits 42 % Konidien beobachtet werden, die in ihrem Zellinnern Kupfer gespeichert hatten.

Abbildung 1 zeigt solche Konidien, die auf dem Spritzmittel-Film klebten und mit Indikator versetzt wurden.

Zu den Versuchen, bei denen die Konidien mit einem Spatel auf die trockenen Fungizidfilme gestrichen worden waren, ist der Einwand berechtigt, daß möglicherweise zwischen und an den Konidien genügend Stoffwechselsubstanzen der Sporen gebunden sind, die das Kupfer aus dem Belag herauslösen. Die Konidien wurden dazu noch aus den Anzuchten im schleimigen Zustand, also voll turgeszent, entnommen. Um diesen Einwand zu entkräften, sind für den nächsten Versuchsansatz die Konidien gewaschen und auf Glasplatten zum Trocknen ausgestrichen worden. Es wurden also die Verhältnisse in der Natur nachgeahmt, wenn die Pilzkolonie austrocknet und die Konidien vom Wind verweht werden können. Im Versuch blieben die Konidien 10 Tage bei Zimmertemperatur auf den Glasplatten. Anschließend ist ein Teil der Sporen auf Agar geimpft und der Rest von den Glasplatten abgenommen und auf trockene Spritzniederschläge der Bordeaux-Brühe aufgestreut worden. Die Glasplatten mit dem Spritzmittelfilm und den Konidien wurden einerseits in feuchte Kammern und andererseits im Freien (Garten) auf dem Erdboden ausgelegt.

Es waren Vorkehrungen getroffen worden, daß die Glasplatten im Garten nicht durch Regenwasser benetzt werden konnten. Die mikroskopische Kontrolle der Konidien bezüglich Kupferaufnahme, die sich auf den Platten in den feuchten Kammern befanden, ist nach der gleichen Methode erfolgt, wie sie schon oben beschrieben wurde. Das Ergebnis dieser Versuche bestätigte nochmals die Vermutungen, die sich aus den ersten Untersuchungen ergeben hatten. Nach zwei Stunden waren 83 % aller Konidien, die sich auf den Glasplatten befanden, (feuchte Kammern), kupferpositiv.

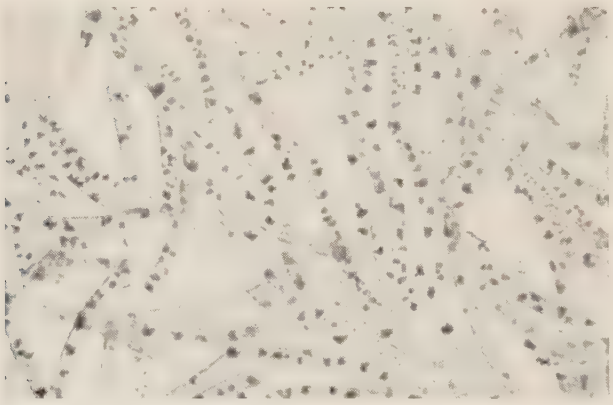

Abb. 2. Konidien von *Fusarium decemcellulare*, die vorsichtig von einer mit Spritzbelag behafteten Glasplatte abgespült wurden, nach Zugabe von Dipenylcabazonlösung. Einwirkungszeit des Fungizids: 4 Stunden. Einwirkungszeit des Indikators: 15 Minuten. Vergrößerung: 450×

Die Konidien auf dem Glas waren feucht. Sie hatten während der Versuchsdauer Wasser mittels ihrer hochhygroskopischen Oberflächensubstanzen lediglich der Luft entnommen.

Der Versuch mit den Glasplatten im Garten — die Konidien verblieben über Nacht im Freien — wurde nach 14 Stunden ausgewertet. Er ergab ähnliche Resultate.

Nach zwei Tagen sind die Abimpfungen auf Agar kontrolliert worden, wobei sich zeigte, daß die Konidien während des zehntägigen Trocknens ihre

Keimfähigkeit nicht eingebüßt hatten. Es wurde also bei den eben beschriebenen Versuchen nicht mit toten Sporen experimentiert.

Werden Konidien, die nach der gleichen Methodik behandelt worden waren, vom Belag abgeschwemmt und mit Kupferindikator versetzt, so bietet sich nach 10 Minuten Indikatoreinwirkung folgendes Bild: Die Kupferkomplexe jeder einzelnen Konidienkammer hatten sich zusammengeballt (Abb. 2), und es scheint keine große Kupfermenge in die Konidien eingedrungen zu sein. Wurden dagegen dieselben Konidien bereits nach 30 Sekunden Indikatoreinwirkung betrachtet, so sehen die gleichen Konidien den Sporen ähnlich, die auf Abbildung 1 gezeigt wurden. Dieses Verhalten der Konidien wurde schon früher beschrieben (Tröger 1957).

Diskussion der Ergebnisse

In der Einleitung ist ausführlich darauf hingewiesen worden, was bis heute an Versuchsergebnissen und Thesen bezüglich des toxischen Wirkens der Bordeaux-Brühe geschrieben wurde.

Fast alle Arbeiten befaßten sich mit dem Herauslösen von toxischem Cu aus den Cu-Ca-Partikeln.

Da ein Lösungsvorgang aber immer Zeit erfordert, die Teilchen in der frisch bereiteten Bordeaux-Brühe jedoch sofort nach ihrem Entstehen toxisch wirken, wurde letzten Endes ein „available copper" (Goldsworthy und Green 1936) postuliert, um die Toxizität der Cu-Ca-Partikeln überhaupt noch erklären zu können, wenn einmal bewußt von der These Villedieu und Villedieus sowie Chaines zur Wirksamkeit der basischen Kupferverbindungen als Oxydationskatalysatoren Abstand genommen wird. (Über Versuche zur Villedieuschen These wird an anderer Stelle berichtet.)

Von Goldsworthy und Green ist leider nichts über die Natur des „available copper in the residues" ausgesagt worden; auch über das Entstehen und die Menge im Niederschlag wurde nichts Näheres berichtet. Bei einer Analyse der Aussagen von Goldsworthy und Green muß aber folgendes festgestellt werden. Das „available copper" begründet sich lediglich auf den Cu-Nachweis mit Hilfe eines Cu-Komplexbildners. Meines Erachtens ist es nicht erlaubt, von frei verfügbarem Kupfer für die Konidien zu sprechen, wenn mit Hilfe von Cu-Komplexbildnern Cu in einer Cu-Verbindung nachzuweisen ist. Jede Substanz, die Affinitäten zum Cu hat, die stärker sind als diejenigen einer anderen Verbindung, wird dieser das Cu entziehen, denn jeder „starke" Komplexbildner entreißt dem „schwächeren" das Metall. In der Bordeaux-Brühe-Partikel hat sich das Cu mit $Ca(OH)_2$ umgesetzt, und es ist eine Verbindung entstanden, der das von Goldsworthy und Green verwendete Nitroso-1,8-dihydroxynaphthalin-3,6-disulfonsäure-Na nun das Cu entzieht und den rot gefärbten stabilen Cu-Komplex bildet.

Verständlich wird das „available copper", wenn angenommen wird, daß die Konidiensubstanz gegenüber Cu ein starker Komplexbildner ist, wie es z. B. für die Konidien von *Fusarium decemcellulare* experimentell (Tröger

1960) ermittelt wurde. Die Affinität der lebenden Konidiensubstanz zum Kupfer war, wie die Versuche ergaben, größer oder ebenso groß wie die Cu-Affinitäten der bekannten Indikatoren zum Cu-Nachweis, wodurch sich in Konidien, die eben gerade mit dem Metallsalz zusammengebracht wurden, das Metall dem Nachweis entzog. Wenn allerdings die Konidiensubstanz starke Affinitäten zum Cu hat, dann ist das Kupfer in den Bordeaux-Brühe-Partikeln — trotz seiner Schwerlöslichkeit — für diese Konidien „available". Unter Annahme der „starken" Komplexaffinität der Konidien zum Kupfer hat also die Aussage von GOLDSWORTHY und GREEN weiterhin Gültigkeit.

Die Probleme der toxischen Wirkung der Bordeaux-Brühe-Partikeln erfahren somit eine Vereinfachung, da nicht mehr nach „löslichmachenden Agentien" des Spritzniederschlages gesucht zu werden braucht, wenn die Pilzsporen — für einen Pilz wurde schon experimentell der Beweis erbracht — starke Komplexaffinitäten zum Cu aufweisen. Wie orientierende Versuche ergaben, scheinen alle Sporen mit schleimiger Oberfläche einschließlich der Pilz-Endosporen starke Affinitäten zu Metallen zu haben. Diese Sporen sind deshalb auch leicht mit Bordeaux-Brühe-Partikeln abzutöten. Bedingung für ein Herauslösen des Cu aus dem Spritzniederschlag ist lediglich das Vorhandensein von Feuchtigkeit, die auf zweierlei Weise das Abtöten der Sporen begünstigt. Einmal bringt Wasser die Sporen mit den Partikeln in engsten Kontakt, und zum anderen sind die Substanzen der Konidien-Oberfläche bei Feuchtigkeit genügend gequollen, um die für die Metallaufnahme große Oberfläche mit metallaffinen Liganden zu gewährleisten. Sporen mit wachshaltigen Wandsubstanzen oder mit winzigen Stacheln, Konidien also, die sich nicht benetzen, die keinen Kontakt mit dem Spritzniederschlag bekommen oder deren Wandsubstanz keine Affinität zum Kupfer aufweist, können also durch Bordeaux-Brühe unter den Bedingungen des Pflanzenschutzes wenig oder nicht geschädigt werden. Vorversuche, die z. B. mit *Aspergillus*- und *Penicillium*-Konidien durchgeführt wurden, deuten in diese Richtung.

Bezüglich des Cu-Nachweises in Konidien, die auf Spritzniederschlägen lagen, ist auszusagen, daß das Ca beim Verändern der Struktur der Zelle — bezogen auf den Cu-Nachweis — besondere Funktionen hat. Ähnlich wie Hitze, oberflächenaktive Substanzen und Schwefel kann Ca die Konidien soweit verändern, daß der Cu-Nachweis in Cu-Ca-versetzten Konidien außerordentlich rasch nach der Cu-Zugabe gelingt. Dieser Befund deutet darauf hin — der positive Cu-Nachweis in kupfervergifteten Konidien war bis jetzt nur in stark geschädigten Konidien möglich —, daß das Abtöten der Konidien durch das Kupfer und Kalzium der Bordeaux-Brühe schneller vor sich gehen muß, als durch $CuSO_4$ allein. Die Abänderung der Zellstruktur scheint dabei nicht von der Alkalität des Spritzniederschlages abhängig zu sein, da auch $CaCl_2$ in kleinsten Mengen den Cu-Nachweis beeinflußt.

Eine Spore, die auf ein Blatt mit Bordeaux-Brühe-Spritzniederschlag gelangt und deren Oberfläche aus hygroskopischen Substanzen (Schleimsubstanzen) besteht, muß sich also zwangsläufig mit den Metallen absättigen, wenn sich die metallaffinen Liganden der Konidienoberfläche mit dem Metall berühren. Kommt tropfbar flüssiges Wasser zum Niederschlag und zur Spore,

so wird darüber hinaus „lösliches" Kupfer aus den schwerlöslichen Cu-Ca-Partikeln in Freiheit gesetzt — These von RECKENDORFER (1936) —, das gleichfalls von der Konidienoberfläche gebunden werden kann. Hatte sich beim Anwehen der Konidien auf dem Blatt kein Kontakt mit dem Spritzniederschlag ergeben, dann wird erst Regen oder Tau Kupfer in zweierlei Weise für die Spore „verfügbar" machen.

Zusammenfassung

1. Der Kupfernachweis in Konidien von *Fusarium decemcellulare*, die mit $CuSO_4$ bzw. Ca-Cu-Verbindungen behandelt wurden, wird maßgeblich von Ca beeinflußt.

2. Konidien, die auf Niederschlägen der Bordeaux-Brühe kleben, müssen sich auf Grund der Metallaffinität der Konidienoberfläche in kürzester Zeit mit Kupfer sättigen.

3. Für die Absättigung der Konidie mit Metall auf Cu-Spritzniederschlägen ist kein tropfbar flüssiges Wasser nötig. Es muß aber gewährleistet sein, daß die hygroskopischen Substanzen der Konidienoberfläche quellen können.

4. Die Versuchsergebnisse geben eine Erklärung für die These des „available copper in the residues" von GOLDSWORTHY und GREEN (1936).

Summary

Studies on the mode of fungicidal action of copper-calcium compounds

1. The amount of copper detected in conidia of *Fusarium decemcellulare* that had been treated with $CuSO_4$ or Ca-Cu compounds is quantitatively influenced by Ca.

2. Conidia attached to residues of Bordeaux mixture quickly will be saturated with copper owing to the affinity for metals of the conidial surface.

3. No fluid water is necessary for the saturation of the conidia with metal on residues of copper sprays. It is however necessary to ensure that the hygroscopic substances of the conidial surface can swell.

4. The results of these experiments provide an explanation of the thesis of "available copper in the residues" of GOLDSWORTHY and GREEN (1936).

Literaturverzeichnis

BARKER, B. T. P., and C. T. GIMMINGHAM, 1911: The fungicidal action of bordeaux mixture. J. agr. sci. 4, 76—94.

BARTH, 1894: Einige neue Beobachtungen über die Blattfallkrankheit der Reben. Landw. Z. Elsaß-Lothring. 34, 265 (die Arbeit war nur im Referat zugänglich).

Burchfield, H. P., and A. Goenaga, 1957: Some factors govering the deposition in tenacity of copper fungicide sprays. Contr. Boyce Thompson inst. **19**, 141—156.

Butler, O., 1914: Bordeaux-mixture. I. Physico-chemical studies. Phytopathology **4**, 125 bis 180.

Chaine, E., 1929: L'action catalique des bouillies cupriques. Progr. agric. vitic. XCI, **16**, 380—385.

Clark, J. F., 1902: On the toxic properties of some copper compounds with special reference to bordeaux mixture. Bot. gaz. **33**, 26—48.

Crandall, C. S., 1909: Bordeaux mixture. Ill. agr. exp. sta. Bull. **135**, 201—296.

Frear, D., 1949: Chemistry of insecticides, fungicides and herbicides. Toronto, New York and London.

Goldsworthy, M. C., and E. L. Green, 1936: Availability of copper of bordeaux mixture residues and its absorption by the conidia of *Sclerotinia fructicola*. J. agr. res. **52**, 517—533.

Horsfall, J. G., 1956: Principles of fungicidal action. Waltham.

Killing, C., 1920: Über die Aktivität von Metallen, welche bei der *Peronospora*-Forschung in Betracht kommen. Wein u. Rebe **2**, 37—50.

Lowry, R. J., A. S. Sussman and B. v. Böventer, 1957: Physiology of the cell surface of *Neurospora* ascospores. III. Distinction between the adsorptive and entrance phases of cation uptake. Mycologia **49**, 609—622.

Lutman, B. F., 1912: The covering power of the precipitation membranes of bordeaux mixture. Phytopathology **2**, 32—41.

Martin, H., 1932: Studies upon the copper fungicides. I. The interaction of copper sulphate with calcium hydroxyde. J. appl. biol. **19**, 98—120.

McCallan, S. E. A., 1930: The solvent action of spore excretions and other agencies on protective copper fungicides. Cornell. agr. exp. Sta. Mem. **128**, 25—79.

— —, 1957: Effectiveness of various formulations of bordeaux mixture in controlling early and late blights of tomato in greenhouse tests. Contr. Boyce Thompson inst. **19**, 157—168.

Millardet, P. M. A., et U. Gayon, 1887: Recherches nouvelles sur l'action que les préparations cuivreuses exercent sur le *Peronospora* de la vigne. J. agr. prat. **51**, 123. Zitiert bei Horsfall 1956.

Nägeli, C. v., 1893: Über oligodynamische Erscheinungen in lebenden Zellen. Denkschr. schweiz. naturforsch. Ges. **33**, 1—51.

Pickering, S. U., 1907: The chemistry of bordeaux-mixture. J. chem. soc. London **91**, 1981—2001.

Reckendorfer, P., 1936: Über den Zerfall des Kupferkalkbrühe-Komplexes (Ein analytischer Beitrag zur Kenntnis des „wasserlöslichen Kupfers"). Z. Pflanzenkrankh. **46**, 418—438.

Swingle, W. T., 1896: Bordeaux mixture, its chemistry, physical properties, and toxic effects on fungi and algae. US dept. agr., veg. phys. path. Bull. **9**, 1. Zitiert bei Horsfall.

Tröger, R., 1956: Studien über die fungicide Kupferwirkung bei *Fusarium decemcellulare*. Arch. Mikrobiol. **25**, 166—192.

— —, 1957: Studien über die Kupferaufnahme in Conidien von *Fusarium decemcellulare*. Arch. Mikrobiol. **26**, 415—421.

— —, 1960: Weitere Studien zur Kupferaufnahme und dem Kupfernachweis bei Conidien von *Fusarium decemcellulare* (Brick). Arch. Mikrobiol. **37**, 134—150.

Villedieu, G., et Mme. Villedieu, 1924: D'action des solutions de sulfate de cuivre sur le mildiou. C. R. acad. sci. (Paris) **179**, 1345—1349.

Wilcoxon, F., and S. E. A. McCallan, 1938: The weathering of bordeaux-mixture. Contr. Boyce Thompson inst. **9**, 149—159.

Wöber, A., 1919: Über die chemische Zusammensetzung der Kupferkalkbrühe. Z. Pflanzenkrankheiten **29**, 94—104.

Wortmann, J., 1919: Untersuchungen über *Peronospora viticola* (de Bary). Wein u. Rebe **1**, 99—144 u. 277—315.

Besprechungen

Bibliographie der Pflanzenschutzliteratur 1952 und 1953, bearbeitet von J. Bärner, herausgegeben von der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft in Berlin-Dahlem. Im Buchhandel zu beziehen durch den Verlag Paul Parey, Berlin und Hamburg. Berlin 1959, 433 Seiten, brosch. DM 65,—, und Berlin 1960, 527 Seiten, brosch. DM 72,—.

In der bekannten Reihe der 1921 von H. Morstatt begründeten „Bibliographie der Pflanzenschutzliteratur" liegt nunmehr in 28 Bänden die Pflanzenschutzliteratur der Welt aus den Jahren 1914 bis 1953 in wohlgeordneter Form vor. Zuletzt erschienen Mitte 1959 der Bibliographieband für das Jahr 1952 und im Frühjahr 1960 ein gleicher Band für das Jahr 1953. Für beide neuen Bände und damit für eine neuerliche, umfassende und mühevolle bibliographische Arbeit zeichnet wiederum, wie schon seit 1953, J. Bärner als der verantwortliche Herausgeber. Auch in den vorliegenden neuen Bänden wurde die — bereits von H. Morstatt eingeführte — Stoffgliederung beibehalten; die Orientierung bei der Literatursuche wird damit für alle bisher erschienenen Jahrgänge in einheitlicher Weise sehr wesentlich erleichtert. Das beigegebene „Vorwort" unterrichtet wiederum in kurzer und prägnanter Form über die technische Handhabung bei der Literatursuche sowie durch Angabe der verwendeten Abkürzungen über die Zitierungsweise der zusammengetragenen Literatur aus aller Welt. Auch wurden Inhaltsverzeichnis, Kapitelüberschriften und Kolumnentitel in der gleichen Weise wie in früheren Bänden in deutscher, englischer und französischer Sprache vorangestellt bzw. angebracht, so daß das Ergebnis dieser mühevollen bibliographischen Arbeit auch den Wissenschaftlern anderer Nationen leicht zugänglich ist. In jedem Einzelfall sind die gesuchten Literaturquellen auch über das anhangsweise beigegebene Autorenverzeichnis unschwer auffindbar. So reihen sich die beiden neuen Jahrgänge würdig und in einer technisch einwandfreien Ausstattung den früheren Bänden an. Als wertvolle literarische Auskunftsquelle wird ihr Inhalt wiederum nicht nur den zunächst unmittelbar angesprochenen Interessenten aus Phytopathologie, Entomologie und Pflanzenschutz zugute kommen, sondern auch den Fachvertretern aus den Nachbardisziplinen, so der Allgemeinen Biologie, dem Pflanzenbau, der Pflanzenzüchtung und hierbei insbesondere der Resistenzzüchtung dienlich sein können.

A. Scheibe, Göttingen

Böning, K., Pflanzenschutz der sich lohnt. Wirtschaftlicher Pflanzenschutz in der Landwirtschaft. BLV Verlagsgesellschaft München—Bonn—Wien, 1960. 223 Seiten mit 67 Abbildungen. Kart. DM 5,80.

Unter Beteiligung von 8 Mitarbeitern versucht K. Böning, der Vorstand der Abteilung Pflanzenschutz der Bayerischen Landesanstalt für Pflanzenbau und Pflanzenschutz, München, mit dieser Broschüre in erster Linie den interessierten praktischen Landwirt anzusprechen, um ihm Erfolge und Probleme des modernen Pflanzenschutzes aufzuzeigen und ihn zur tätigen Mithilfe anzuregen. Es wurden nur die hauptsächlichsten Krankheiten und Schädlinge, denen eine größere wirtschaftliche Bedeutung zukommt, getrennt nach den Kulturarten Getreide, Kartoffeln, Rüben, Futterpflanzen und Dauergrünland behandelt. In besonderen Kapiteln werden die Maßnahmen gegen Bodenschädlinge, Kleinsäuger und Vögel besprochen. Knapper gefaßt sind die Pflanzenschutzmaßnahmen in den Sonderkulturen Ölfrüchte, Hülsenfrüchte, Feldgemüse und im Obstbau.

Böning ordnet im einleitenden Abschnitt den Pflanzenschutz in den Rahmen der gesamten ackerbaulichen und betriebswirtschaftlichen Aufgaben ein und zeigt deutlich, daß die Anwendung chemischer Mittel nicht unbedingt als Ultima ratio angestrebt wird, aber vielfach als einzig möglicher und wirtschaftlicher Weg zum Ziel führt, ohne daß sich hieraus irgendwelche Nachteile für den Verbraucher ergeben müssen.

Die Ganzheitsbetrachtung der landwirtschaftlichen Probleme und die Eingliederung der unmittelbaren Abwehrmaßnahmen gegen Krankheiten und Schädlinge wird von allen Sachbearbeitern angestrebt. Deutlich herausgestellt wird das Hauptargument für die Durch-

führung der Pflanzenschutzmaßnahmen, die Erhaltung bzw. Steigerung der landwirtschaftlichen Erträge. Eindringliche Zahlenbeispiele mit Angaben über Aufwand und Mehrertrag zeigen die Wirtschaftlichkeit der Maßnahmen, die durch einige Abbildungen noch unterstrichen wird. Die Empfehlungen sind für die bayerischen Verhältnisse zugeschnitten, was eine Allgemeingültigkeit der meisten Angaben aber nicht ausschließt. In diesem Sinne ist der vorliegenden Schrift viel Erfolg zu wünschen. G. SCHUHMANN, Berlin-Dahlem

Mitteilungen aus der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft Berlin-Dahlem, **Heft 99:**

Hackfruchtkrankheiten und Nematodenforschung. 1960. 119 Seiten, 27 Abbildungen, 5 Tafeln. Kart. DM 13,50. Im Buchhandel zu beziehen durch den Verlag Paul Parey, Berlin und Hamburg.

Als „Festschrift anläßlich der Einweihung des Neubaues für das Institut für Hackfruchtkrankheiten und Nematodenforschung" in Münster dokumentiert das vorliegende Heft vor allem die erfreuliche Tatsache, daß der an wirtschaftlicher und wissenschaftlicher Bedeutung gewinnenden „Phytonematologie" nunmehr auch in Deutschland institutionell eine Heimstätte geschaffen ist, sondern daß das Außeninstitut der BBA in Münster, dessen Geschichte der erste Aufsatz gewidmet ist, einen zweckmäßigen und würdigen Rahmen gefunden hat. Obgleich die erste, 1891 gegründete pflanzenschutzliche Versuchsstation in Halle vordringlich der „Nematodenvertilgung" gewidmet war, hielt die Entwicklung der Nematodenforschung in Deutschland in den letzten 20 Jahren mit dem Ausbau in unseren Nachbarländern nicht Schritt, obgleich auch bei uns immer drängendere Probleme zu lösen sind. Der ja weit über die deutschen Grenzen geschätzte Leiter des Institutes in Münster, der über diese Entwicklung berichtet, verschweigt seinen persönlichen Anteil an der Entwicklung dieses Arbeitsgebietes. In einem dritten Beitrag berichtet GOFFART über „Die taxonomische Bewertung morphologisch-anatomischer Merkmale bei den Zysten der Gattung Heterodera" und zeigt unter Beigabe sehr klarer Originalfotos die Bedeutung von Feinstrukturen, vor allem der Zystenoberfläche und des Wohlwarkegels für die sichere Artbestimmung auf; eine Übersicht über die allgemeinen Merkmale der in Deutschland bekannten Arten wird dem interessierten Leser willkommen sein. WEISCHER berichtet über den „Einfluß des Bodens auf die Verbreitung pflanzenparasitärer Nematoden in Rebanlagen". Die praktische Bedeutung von Nematodenschäden in Weinbergen führte auf Grund der sehr unterschiedlichen Bodenbeschaffenheit des Rebstandes zu auch allgemein sehr aufschlußreichen ökologischen Feststellungen zum Teil an neu aufgefundenen Arten. In einem weiteren Beitrag berichtet WEISCHER, daß ruhende Nematodenlarven wesentlich unempfindlicher gegen die Strahlung des Radiums sind als aktivierte Tiere, welche bereits durch geringe Strahlendosen geschädigt werden.

Unter den Hackfruchtkrankheiten, dem klassischen Arbeitsgebiet des Instituts und vor allem seiner Außenstelle in Elsdorf, werden vor allem die Virosen bearbeitet. HEILING berichtet über den „Einfluß von Blattzustand und Blattverlust auf Wachstum und Stoffwechsel vergilbungskranker Rübenpflanzen" und kommt auf Grund wachstums- und stoffwechselphysiologischer Untersuchungen zu dem Schluß, daß in Vergilbungslagen Blattschäden anders bewertet werden müssen als in gesunden Beständen und daß für die Gewinnung qualitativ guter Rüben in Vergilbungslagen die Ernte zu jenem Zeitpunkt erfolgen sollte, in dem der Blattneuaustrieb eine gewisse Höhe erreicht hat, aber noch vergilbungsfrei ist. Ein Zustand, der bei günstiger Herbstwitterung bei Späternte erreicht werden könnte. BURCKHARDT schließt aus „Untersuchungen über die viröse Vergilbung der Stoppelrüben", daß es sich um ein früher nicht beobachtetes persistentes durch Pfirsich- und Kohllaus, aber nicht durch Preßsaft übertragenes Virus handelt, das an Stoppelrüben, aber weniger an Kohlrüben ähnlich hohe Wachstumsschäden wie Kräuselmosaik hervorruft. Das Heft schließt mit einem Bericht von STEUDEL über „Fortgesetzte Feldversuche zur inneren Therapie der Betarüben mittels systemischer Saatschutzpräparate". Zweijährige Versuche mit „Disyston" zeigten, daß auch bei sehr starkem Befall die Saatgutbehandlung mindestens die gleiche Wirkung hat wie die erste der früher empfohlenen Metasystoxbehandlungen. Trotz eines gewissen Rückganges der Pflanzenzahl wurden durch Gaben von 6 % Disyston zur Saat ohne weitere Schutzmaßnahmen die Zuckererträge um 7 % gesteigert. FUCHS, Göttingen

Handbuch des gesamten Gemüsebaues

einschließlich der Küchenkräuter

Von Dr. h. c. J. Becker-Dillingen

6., neubearbeitete Auflage. 1956. 770 Seiten mit 253 Abbildungen und zahlreichen Tabellen. Ganzleinen DM 78,—

Das „Handbuch des gesamten Gemüsebaues" ist seit über 30 Jahren das umfassendste Standardwerk über den Gemüsebau in deutscher Sprache. Es behandelt eingehend alle Fragen des Gemüsebaues, seine Wirtschafts- und Marktgrundsätze und seine Technik von der Freilandkultur bis zur Gemüsetreiberei. Sämtliche gebräuchliche Gemüsearten werden entsprechend ihrer wirtschaftlichen Bedeutung ausführlich behandelt; für den Praktiker besonders wertvoll sind die präzisen, auf jede Gemüseart bezogenen Angaben über Sorten, Saat, Wachstumsbedingungen, Fruchtfolge, Düngung und Schädlinge, Nahrungswert und Verwertung.

„Ganz sicher ist dieses Buch das beste, das über den Gemüsebau in allen seinen Nuancen geschrieben worden ist, wodurch es sowohl für den praktischen Züchter als auch für die Wissenschaftler und für alle, die Unterweisung und Belehrung geben können, von unschätzbarem Wert sein wird." *De Tuinderij*

Obstbau

Grundlagen, Anbau und Betrieb

Von Prof. Dr. Fr. Hilkenbäumer

3., neubearbeitete Auflage. 1953. 367 Seiten mit 331 Abbildungen und 1 Farbtafel. Ganzleinen DM 28,—

In diesem bewährten und bekannten Werk wird das Gesamtgebiet des Obstbaues in einer glücklichen Verbindung von bestem handwerklichem Können und gründlichster Wissenschaftlichkeit — unter Zugrundelegung der Erfahrungen in den Obstbau treibenden Ländern der Welt — lückenlos behandelt. Die wissenschaftlichen Forschungsergebnisse stehen in Beziehung zu ihrer praktischen Nutzanwendung. Im einzelnen hervorgehoben sind die besondere Bedeutung der Wirkstoffe, die mineralische Ernährung, der Pflanzenschutz sowie die betriebswirtschaftlichen Probleme.

„Das vorliegende Buch zählt zu den Standardwerken des Obstbaues. Es wendet sich ebenso an den Praktiker wie an den Wissenschaftler und ist durch seinen didaktisch klaren Aufbau besonders auch für den Lernenden im Obstbau geeignet." *Angewandte Botanik*

VERLAG PAUL PAREY / BERLIN UND HAMBURG

Pareys Illustriertes Gartenbaulexikon

Fünfte, völlig neugestaltete Auflage 1955/1956

Unter Mitwirkung zahlreicher namhafter Fachleute
des gärtnerischen Berufsstandes aus dem In- und Ausland herausgegeben von

Professor Richard Maatsch
Direktor des Instituts für Zierpflanzenbau, in Hannover

Zwei Bände A—K und L—Z im großen Lexikonformat
mit zusammen 1379 Seiten und 1373 Abbildungen

Ganzleinen DM 162,—; Halbleder DM 169,—; Teilzahlungspreis DM 178,— bzw. DM 186,—

Pareys Illustriertes Gartenbaulexikon ist ein auf der Höhe seiner Zeit stehendes, reich illustriertes und auf das beste ausgestattete Nachschlagewerk über alle Fragen des Gartenbaues. Sämtliche mit dem Gartenbau zusammenhängende Gebiete werden von maßgeblichen Fachleuten in prägnanter Kürze, aber doch erschöpfend behandelt, daß Wissenschaft und Praxis aus der Benutzung wertvolle Anregung und Gewinn ziehen können.

„Unter Mitwirkung zahlreicher Autoritäten des In- und Auslandes ist hier ein Werk entstanden, das wirklich etwas Einmaliges darstellt. Es gibt wohl kaum eine Frage aus dem gesamten weitschichtigen Gebiet des Gartenbaues, auf welche das vorliegende Lexikon die Antwort schuldig bleibt. Abgesehen davon, daß die botanische Bezeichnung von Zier- und Nutzgewächsen endlich eine durchgehende Berichtigung erfährt, findet der Berufsgärtner, Gartentechniker, Fachlehrer und Wissenschaftler über sämtliche Probleme erschöpfende Auskunft. Aber auch der Gartenliebhaber und Blumenfreund wird sich glücklich schätzen, ein Nachschlagewerk zu besitzen, das nie versagt, wozu der Bilderreichtum noch beiträgt."

Schweiz. Pflanzenfreund

„Ich glaube wohl, daß das Werk als Nachschlagewerk den Zweck vollkommen erfüllt. Es bürgt uns ja auch ein Stab von fachkundigen Mitarbeitern unter Leitung von Prof. Maatsch dafür. Es gibt kein Gebiet des Gartenbaues und der verwandten Wissenschaften, das nicht behandelt worden ist. Überdies ist eine sehr große Anzahl in den Text eingelegter Abbildungen sehr instruktiv. Alles zusammen können wir dieses Werk allen Interessierten von Herzen empfehlen. Man wird es oft und mit Erfolg zu Rate ziehen." *De Tuinderij*

VERLAG PAUL PAREY / BERLIN UND HAMBURG